

**Inter- und intramolekulare Aktivierung
der Reaktion der Pankreas-Ribonuclease
und Zuordnung der kinetischen Konstanten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Hans-Joachim Wieker
aus Wesermünde

Marburg/Lahn 1966



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Inter- und intramolekulare Aktivierung
der Reaktion der Pankreas-Ribonuclease
und Zuordnung der kinetischen Konstanten**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Hans-Joachim Wieker
aus Wesermünde

Marburg/Lahn 1966



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am 29. Juni 1966

Tag der mündlichen Prüfung am 2. Juli 1966

Berichterstatter: Doz. Dr. Dr. H. Witzel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Kuhn

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	IV
A. Interpretation der kinetischen Parameter und ihre Zuordnung im Reaktionsmechanismus der RNase	1
I. Problemstellung	1
II. Kinetische Untersuchungen unter Zusatz von Modifizierern	8
III. Reaktionsschemas für die unkompetitive Aktivierung und ihre mathematischen Konsequenzen	12
IV. Interpretation der Konstanten k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} , K_m	21
V. Der Mechanismus der RNase-Reaktion	27
VI. Zum Verhältnis $k_{-1} : k_{+2}$	32
VII. Schlußfolgerungen	33
B. Weitere Untersuchungen zur Natur der unkompetitiven Aktivierung	35
C. Der Einfluß von Seiten der zweiten Ester- komponente in Dinucleosidphosphaten	42
I. Problemstellung	42
II. Kinetische Untersuchungen	44
III. Diskussion zur Bindung zwischen dem 5'-Nucleosid und der RNase	54
IV. Diskussion über Wechselwirkungen zwischen den beiden Heterocyclen der Dinucleosidphosphate	57
V. Weitere Diskussion der Temperaturabhängigkeit	66

III

	Seite
D. Der Mechanismus der unkompetitiven Aktivierung	68
I. Reine unkompetitive Aktivierung	68
II. Unkompetitive Aktivierung und kompetitive Hemmung	75
E. Zusammenfassung	80
F. Experimenteller Teil	82
I. Kinetische Messungen	82
II. Vergleichbarkeit kinetischer Daten	85
III. Allgemeine Arbeitsmethoden	88
IV. Darstellung der Substrate	89
G. Literaturverzeichnis	94

Verzeichnis der Abkürzungen

In den kinetischen Ableitungen werden folgende Symbole verwendet:

A	Aktivator
a	Aktivatorkonzentration
E	Enzym
e	totale Enzymkonzentration
EA	Enzym-Aktivator-Komplex
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESA	Komplex aus Enzym, Substrat und einem Aktivator
EZ	Enzymstabilisierter Zwischenzustand
EZA	Komplex aus enzymstabilisiertem Zwischenzustand und einem Aktivator
$\Delta G_1^x, \Delta G_2^x$	Freie Aktivierungsenthalpie für k_{+1}, k_{+2}
$\Delta H_1^x, \Delta H_2^x$	Aktivierungsenthalpie für k_{+1}, k_{+2}
h	Plancksches elementares Wirkungsquantum = $6,623 \cdot 10^{-27}$ erg.sec
I	Inhibitor
i	Inhibitorkonzentration
k_B	Boltzmannsche Konstante = $1,38 \cdot 10^{-16}$ erg/grd.
k_{+1} etc.	Geschwindigkeitskonstanten
k^0	v/e für $s = \infty$
K^0	Substratkonzentration, die $v/e = k^0/2$ gibt
K_i	Dissoziationskonstante von EI
K_m	Briggs-Haldane-Konstante
K_S	Dissoziationskonstante von ES
P	Produkt
p	Produktkonzentration
R	Allgemeine Gaskonstante = $1,9865$ cal/grd.Mol

$\Delta S_1^*, \Delta S_2^*$	Aktivierungsentropie für k_{+1}, k_{+2}
S	Substrat
s	Substratkonzentration
SA	Substrat-Aktivator-Komplex
T	Temperatur
t	Zeit
v	Reaktionsgeschwindigkeit
w	Konzentration an SA
x	Konzentration an ES oder EZ
y	Konzentration an ESA
z	Konzentration an EA
α, β, γ	Faktoren für Geschwindigkeitskonstanten
γ, Φ	Faktoren für k^0 und K^0
ξ	Steigung der Geraden im $e/v-1/s$ -Diagramm

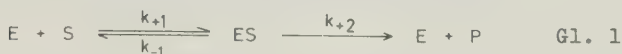
Die Bezeichnung der nucleosidischen Produkte erfolgt nach den Vorschlägen in J. Biol. Chem. (Terminology and Abbreviations):

A, G, C, U	sind die Nucleoside Adenosin, Guanosin, Cytidin, Uridin.
A-N-1-oxid	Adenosin-N-1-oxid (analog bei anderen substituierten Nucleobasen)
Ap etc.	sind die entsprechenden 2'- u. 3'-Nucleotide
ATP	Adenosintriphosphat
CpA etc.	sind Dinucleosidphosphate mit 3' $\rightarrow$ 5'-Verknüpfung
ApCp etc.	sind Dinucleotide mit 3' $\rightarrow$ 5'-Internucleotidbindung und 2'- oder 3'-endständiger Phosphatgruppe.
Up(c) etc.	sind 2',3'-cyclische Nucleotide
Up-methyl etc.	sind die entsprechenden Alkyl- oder Aryl-ester
RNS	Ribonucleinsäure
RNase	Pankreas-Ribonuclease A (2.7.7.16).

A. Interpretation der kinetischen Parameter
und ihre Zuordnung im Reaktionsmechanismus
der RNase

I. Problemstellung

Kinetische Untersuchungen, die vielfach zur Aufklärung des Mechanismus der RNase-katalysierten Hydrolyse von RNS herangezogen worden sind, haben ergeben, daß auf sie das Reaktionsschema



anwendbar ist ⁺⁾ , worin E für Enzym, S für Substrat, P für Produkt und ES für einen Komplex aus Enzym und Substrat stehen.

Hierfür gelten die Geschwindigkeitsgleichungen

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{+2}}{1 + \frac{K_m}{S}} \quad \text{Gl. 2}$$

$$\frac{e}{v} = \frac{1}{k_{+2}} + \frac{K_m}{k_{+2}} \cdot \frac{1}{S} \quad \text{Gl. 3}$$

⁺⁾ Da nur die Anfangsgeschwindigkeiten betrachtet werden ($p=0$), gehen Gleichgewichte zwischen E und P nicht in die Kinetik ein, und es ist unerheblich, ob $ES \rightarrow EP \rightleftharpoons E + P$ gesetzt wird, weil hier $EP \rightarrow E + P$ nicht geschwindigkeitsbestimmend ist (s.S. 22).

Für K_m gilt darin die allgemeine Definition

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad \text{Gl. 4}$$

Zur Aufklärung eines Reaktionsmechanismus aus kinetischen Untersuchungen werden oftmals einer Enzymreaktion Substanzen zugesetzt, die zwar nicht in die Stöchiometrie der Reaktion eingehen, jedoch hemmend oder aktivierend auf sie einwirken. In der Literatur werden diese Substanzen allgemein als "Modifizierer" bezeichnet, die sich je nach ihrer Wirkung weiter in "Inhibitoren" oder "Aktivatoren" spezifizieren lassen.

Jede kinetische Messung über die Abhängigkeit zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit (v) und der Substratkonzentration (s) liefert stets nur zwei Parameter, K_m und k_{+2} . In Gegenwart eines Modifizierers werden daraus komplexe Konstanten, die sich aus denen des Substrats und des Modifizierers zusammensetzen.

In der vorliegenden Arbeit werden deshalb diese bei der Auswertung direkt zu ermittelnden Parameter mit k^0 und K^0 bezeichnet, wobei k^0 als Funktion von k_{+2} und K^0 als Funktion von K_m betrachtet werden. Dann gilt die allgemeine Geschwindigkeitsgleichung

$$\frac{v}{e} = \frac{k^0}{1 + \frac{K^0}{s}} \quad \text{Gl. 5}$$

und für die hier stets verwendete Auswertung nach Lineweaver-Burk (1) gilt

$$\frac{e}{v} = \frac{1}{k^0} + \frac{K^0}{k^0} \cdot \frac{1}{s} \quad \text{Gl. 6}$$

Trotz der vielen bereits vorliegenden kinetischen Daten ließ sich bisher nicht klären, ob der RNase-Reaktion eine reine Michaelis-Menten-Kinetik (2) mit einem sich sehr schnell einstellenden Gleichgewicht $E + S \rightleftharpoons ES$ mit $K_m = K_s = k_{-1}/k_{+1}$ (Gl.7) ⁺⁾ oder eine Briggs-Haldane-Kinetik (3) mit $K_m = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ (Gl.4) zugrunde liegt. Dementsprechend werden die kinetischen Konstanten noch immer unterschiedlich interpretiert.

So diskutiert Rabin (4) die RNase-Reaktion auf der Basis einer reinen Michaelis-Menten-Kinetik: k_{+1} und k_{-1} sind Geschwindigkeitskonstanten eines sich sehr schnell einstellenden Gleichgewichts mit einer Dissoziationskonstanten ⁺⁾

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad \text{Gl. 7}$$

und k_{+2} ist die Zerfallskonstante der Reaktion $ES \longrightarrow E + P$ und ist vernachlässigbar klein gegenüber k_{-1} ($k_{-1} \gg k_{+2}$).

⁺⁾ In den Arbeiten von Rabin steht $k_{-1}/k_{+1} = K_m$. Um den Unterschied zu $K_m = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ deutlicher zu machen, wird hier für die Dissoziationskonstante stets K_s gesetzt, wie auch von der Commission on Enzymes (5) vorgeschlagen wird.

In der Argumentation für $K_S = k_{-1}/k_{+1}$ bezieht sich Rabin auf theoretische Ableitungen von Morales (6), denen zufolge K_m dann eine Gleichgewichtskonstante ist, wenn ein Modifizierer eine nicht-kompetitive Hemmung hervorruft. Mit dem als nicht-kompetitiver Inhibitor fungierenden Glykol hat Rabin (4) aber keinen Modifizierer im Sinne Morales', sondern einen weiteren Reaktionspartner eingesetzt; denn neben der Hydrolyse erfolgt auch eine Alkoholyse des cyclischen Diesters (7). Und da mit der von Rabin verwendeten pH-stat-Methode nur die Bildung des Hydrolyse-Produkts, jedoch nicht die des Alkoholyse-Produkts kinetisch erfaßt wird, ist es unzulässig, daraus Schlüsse über die Umsetzungsgeschwindigkeit des Substrats zu ziehen. Somit erweisen sich diese Untersuchungen von Rabin als ungeeignet für Schlußfolgerungen über K_m .

Als weiteren Anhaltspunkt für Gl.7 führt Rabin die Parallelität der pH-Abhängigkeit von K_m und der Konstanten für die Hemmung (K_i) durch einen Inhibitor wie Cp an, obgleich das bei $pH < 4,5$ nicht mehr zutrifft.

Da aber diese Parallelität von K_m und K_i immer dann bestehen muß, wenn Substrat und Inhibitor über analoge Gruppen an das Enzym gebunden werden und die Wasserstoffionen-Konzentration lediglich das Verhältnis von aktivem zu inaktivem Enzym bestimmt, lassen sich aus diesen Untersuchungen von Rabin keine Rückschlüsse darüber gewinnen, ob K_m eine Gleichgewichtskonstante darstellt.

Ein weiteres Argument, K_m als Gleichgewichtskonstante zu interpretieren, leitet Rabin aus der Kinetik der Substrate des ersten Schritts der RNase-Reaktion ab: Bei allen bisherigen Untersuchungen über die Umesterung von 3'-Nucleotidestern wurde gefunden, daß die K_m -Werte praktisch konstant ^{+) und gleich denen der cyclischen Diester sind. Hingegen liegen die k_{+2} -Werte der Dinucleosidphosphate 10 - 6000mal höher als die der Nucleotidalkylester und cyclischen Diester (9).}

Während die Konstanz von K_m mit den obigen Postulaten gedeutet werden kann, erklärt Rabin die hohen k_{+2} -Werte mit einer zusätzlichen Bindung zwischen der RNase und dem 5'-Nucleosid, die eine bessere Orientierung der Estersauerstoffatome am aktiven Zentrum und damit höhere Geschwindigkeiten bewirken soll. Jedoch führen k_{+2} -Werte von 10^4 sec^{-1} , wenn tatsächlich $k_{-1} \gg k_{+2}$ ist, bei $K_S \approx 10^{-3} \text{ M}$ zu k_{+1} -Werten von $10^9 (\text{M} \cdot \text{sec})^{-1}$, was zu der Forderung führen würde, daß eine Mehrzentrenreaktion mit Geschwindigkeiten ablaufen soll, die sonst nur bei rein diffusionskontrollierten Reaktionen gefunden werden.

Jedoch ist auch eine andere Interpretation für die Konstanz von K_m bei stark veränderten k_{+2} -Werten möglich: so nimmt Witzel an, daß k_{-1} und k_{+1} um denselben Faktor erhöht sind wie k_{+2} (10).

^{+) Ein Parameter wird dann als "konstant" oder "unverändert" bezeichnet, wenn er sich nur wenig, ein anderer im Vergleich dazu sehr stark ändert. Variieren beide in vergleichbaren Größenordnungen, so müssen bei beiden auch kleine Änderungen berücksichtigt werden.}

Diese Interpretation konnte von Rabin aber nicht ausgeschlossen werden. Demzufolge sind auch die kinetischen Daten der Dinucleosidphosphate kein triftiges Argument für seine Postulate.

Witzel ordnet die Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} drei definierten Reaktionsschritten zu (S.28): der basenkatalysierten Bildung eines enzymstabilisierten Zwischenzustands (k_{+1}) und dessen säurekatalysiertem Zerfall in $E + S$ (k_{-1}) und $E + P$ (k_{+2}). Beide Katalysen werden von der Pyrimidinbase bzw. ihrer konjugaten Säure durchgeführt, und die Konstanten k_{+2} und k_{-1} sind gekoppelt, weil in diesen Schritten der Zerfall des enzymstabilisierten Zwischenzustands durch dieselbe Säure katalysiert wird: das Proton am C-2-Sauerstoff des Pyrimidinrings kann auf eines der beiden Estersauerstoffatome übertragen werden. Werden die Reaktionsgeschwindigkeiten durch die Aktivierungsenergien für die Uebergänge der Base in ihre konjugate Säure und umgekehrt bestimmt, können Veränderungen der Säure- und Basenkatalyse um denselben Faktor resultieren. Das führt dann zu einer Konstanz von K_m .

Eine eindeutige Interpretation der kinetischen Parameter wäre möglich, wenn alle Geschwindigkeitskonstanten gesondert zu bestimmen wären. Hammes (8) hat hierzu Relaxationszeitmessungen vorgenommen, aber diese Methode läßt sich nur auf Gleichgewichte anwenden, setzt also die Richtigkeit der Interpretation von Rabin bereits voraus.

Demzufolge können nur Wechselwirkungen zwischen der RNase und Inhibitoren untersucht werden, jedoch keine Wechselwirkungen zwischen der RNase und ihren

Substraten. Da aber nicht ohne weiteres Analogieschlüsse von Inhibitoren auf Substrate gezogen werden können, lassen sich vorerst keine Anhaltspunkte über die Reaktionskonstanten durch Relaxationszeitmessungen gewinnen.

Eine andere Möglichkeit, die Bedeutung der kinetischen Parameter zu klären, schien mir darin zu bestehen, daß ein Modifizierer-System mit einem neuen, aber übersichtlichen Kinetiktyp geeignet sein sollte, einzelne Postulate auf ihre Gültigkeit zu prüfen oder ihre Unhaltbarkeit zu beweisen. Denn aus den Interpretationen von Rabin und Witzel ergeben sich wegen der darin enthaltenen Postulate unterschiedliche Konsequenzen rein mathematischer Natur:

In der Interpretation von Witzel ist die Möglichkeit gegeben, daß bei einer Aenderung von k_{+2} jede beliebige Aenderung von k_{-1} und k_{+1} (und damit auch von K_m) auftreten kann. - Solange die Aenderung von k_{+2} nur auf einer Veränderung der Katalysatoreigenschaften der Pyrimidinbase beruht, müssen sich k_{-1} und k_{+2} stets um denselben Faktor ändern, so daß das Verhältnis $k_{-1} : k_{+2}$ konstant bleibt. Dadurch ist es möglich, daß auch Aenderungen von K_m und k_{+2} um denselben Faktor auftreten.

Rabins Forderung, k_{-1} sei die Zerfallskonstante in einem sich sehr schnell einstellenden Enzym-Substrat-Gleichgewicht und k_{+2} sei eine Reaktionskonstante und vernachlässigbar klein gegenüber k_{-1} , bedingt, daß niemals eine Aenderung von K_m und k_{+2} um denselben Faktor auftreten kann, solange k_{+2} kleiner als $\text{ca. } 10^4 \text{ sec}^{-1}$ bleibt.

II. Kinetische Untersuchungen unter Zusatz von Modifizierern

Zu diesem Zweck habe ich die Wirkung verschiedener Adeninderivate auf die RNase-katalysierte Hydrolyse von Cp(c) und Up(c) untersucht. Dabei fand ich eine merkliche und charakteristische Veränderung der kinetischen Parameter, wie aus den Abb. 1-4 zu ersehen ist.

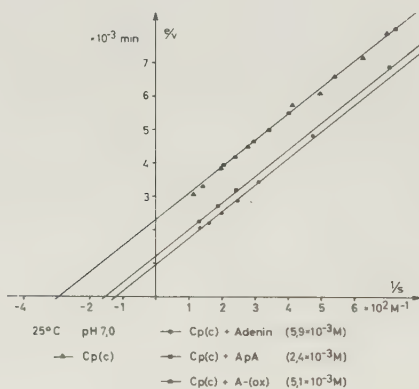


Abb. 1

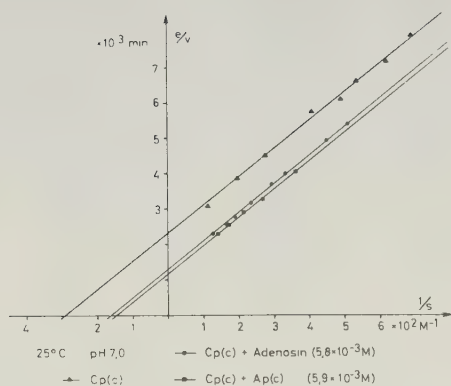


Abb. 2

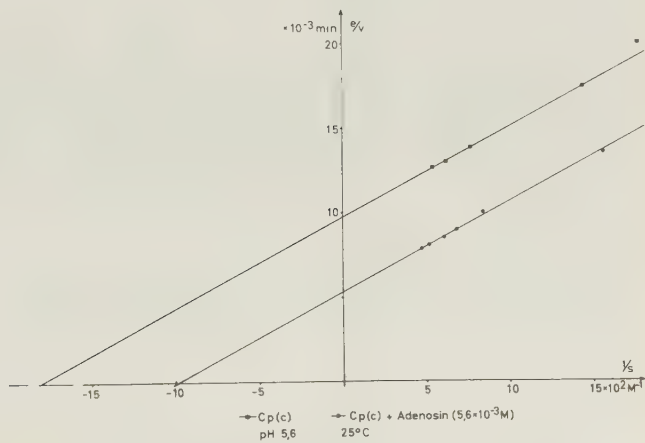


Abb. 3

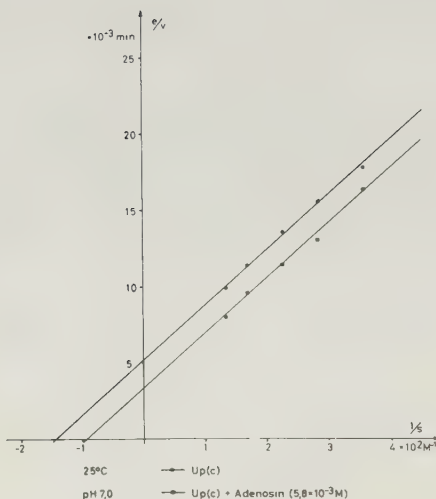


Abb. 4

Während in allen Fällen im Lineweaver-Burk-Diagramm die Steigungen $\bar{v}$ ($\bar{v} = K^0/k^0 = K_m/k_{+2}$) konstant bleiben, sind bei Zusatz von Adenin, Adenosin, Ap(c) und ApA die gemessenen K^0 - und k^0 -Werte jeweils um denselben Faktor größer als K_m und k_{+2} . Adenosin-N-1-oxid hat keinen Einfluß auf die Reaktion.

In den Tab. 1-3 sind die gemessenen Werte und die Faktoren $\bar{\Phi}$ und $\bar{\psi}$ zusammengestellt, wobei gilt:

$$\bar{\Phi} = \frac{K^0}{K_m} \quad \text{Gl. 8}$$

$$\bar{\psi} = \frac{k^0}{k_{+2}} \quad \text{Gl. 9}$$

Zusatz	K^0 ($10^{-3}M$)	k^0 (sec^{-1})	$\Phi = \gamma$
ohne	3,5	7,3	1,0
Adenin 5,9 mM	8,3	17,6	2,4
Adenosin 5,8 mM	6,3	13,1	1,8
A-N-1-oxid 5,1 mM	3,5	7,3	1,0
Ap(c) 5,9 mM	6,9	14,5	2,0
ApA 2,4 mM	6,7	14,2	1,9

Tab. 1 Cp(c) + Adeninderivate (s. Abb.1-2)
pH 7,0 - 25° C - in 0,2M NaCl

Zusatz	K^0 ($10^{-3}M$)	k^0 (sec^{-1})	$\Phi = \gamma$
ohne	5,5	1,7	1,0
Adenosin	10,2	3,2	1,9

Tab. 2 Cp(c) + Adenosin (5,6 mM) (s. Abb.3)
In CH_3COONa -Puffer I = 0,2M
pH 5,6 - 25° C

Zusatz	K^0 ($10^{-3}M$)	k^0 (sec^{-1})	$\Phi = \gamma$
ohne	6,9	3,2	1,0
Adenosin	10,7	5,0	1,6

Tab. 3 Up(c) + Adenosin (5,8 mM) (s. Abb.4)
pH 7,0 - 25° C - in 0,2M NaCl

Diese von Substanzen mit unverändertem Adenin-Heterocyclus hervorgerufene Aktivierung zeigt eine Parallelverschiebung der Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm, wie sie sonst in entgegengesetzter Richtung bei einer unkompetitiven Hemmung beobachtet wird. Aus diesem Grund wird der hier beschriebene Typ der Aktivierung im folgenden "unkompetitive Aktivierung" genannt. Dadurch soll vermieden werden, daß vor der internationalen Neuordnung dieser Begriffe weitere Bezeichnungen eingeführt werden.

III. Reaktionsschemas für die unkompetitive Aktivierung und ihre mathematischen Konsequenzen

Eine mögliche Erklärung für die Änderungen von k_{+2} und K_m um denselben Faktor besteht in der Annahme $k_{+2} \gg k_{-1}$, so daß k_{-1} gegenüber k_{+2} zu vernachlässigen wäre:

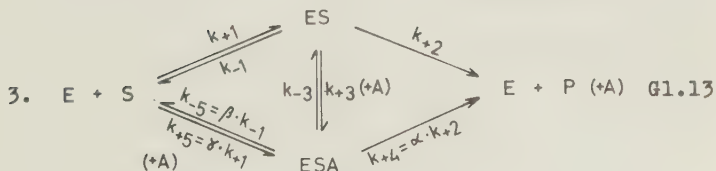
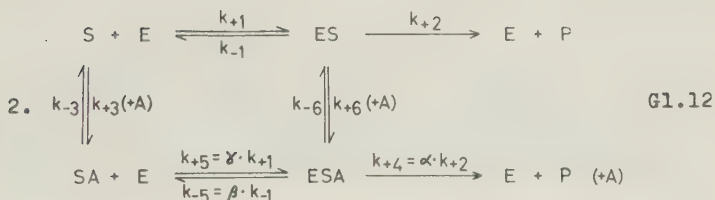
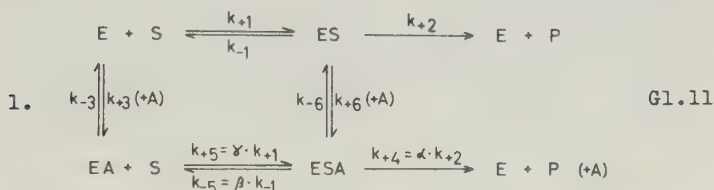
$$K_m = \frac{k_{+2}}{k_{-1}} \quad \text{Gl. 10}$$

Diese dem Postulat von Rabin konträre Annahme wird durch keinen der vielen kinetischen Befunde über die RNase-Reaktion gerechtfertigt. Jedoch weisen einige Daten, z.B. die Bildung von 3'-Nucleotidalkylestern aus 2',3'-cyclischen Diestern in alkoholischen Medium (7, 11) -Rückreaktion des ersten Schritts der RNase-Reaktion, wobei k_{-1} des ersten Schritts gleich k_{+2} der dem zweiten Schritt analogen Alkoholyse ist-, darauf hin, daß die Annahme der Gl. 10 nicht zutrifft.

Somit gilt es, Reaktionsschemas zu entwerfen, in denen die verschiedenen Möglichkeiten einer Wechselwirkung zwischen dem Aktivator (A) und

1. dem Enzym (E),
2. dem Substrat (S),
3. dem Enzym-Substrat-Komplex (ES)

berücksichtigt werden. Dafür kommen in Frage (siehe Fußnote Seite 1):



Im Rahmen der folgenden theoretischen Ableitungen kann ES einen Enzym-Substrat-Komplex nach Michaelis-Menten (Rabin) oder einen enzymstabilisierten Zwischenzustand (Witzel) symbolisieren. Gleiches gilt für ESA.

Mit $[A] = a$, $[S] = s$, $[ES] = x$, $[ESA] = y$, $[EA] = z$, $[AS] = w$ lassen sich daraus die folgenden "steady-state"-Ansätze ableiten. Weiterhin gilt in allen drei Fällen Gl. 14

$$v = k_{+2} \cdot x + k_{+4} \cdot y \quad \text{Gl. 14}$$

Für Gl. 11 folgt:

$$k_{+1}s(e-x-y-z) + k_{-6}y = (k_{-1}+k_{+2})x + k_{+6}ax \quad \text{Gl. 15a}$$

$$k_{+5}sz + k_{+6}ax = (k_{-5}+k_{+4})y + k_{-6}y \quad \text{Gl. 15b}$$

$$k_{+3}a(e-x-y-z) = k_{-3}z \quad \text{Gl. 15c}$$

Für Gl. 12 folgt:

$$k_{+1}(s-w)(e-x-y) + k_{-6}y = (k_{-1}+k_{+2})x + k_{+6}(a-w)x \quad \text{Gl. 16a}$$

$$k_{+5}w(e-x-y) + k_{+6}(a-w)x = (k_{-5}+k_{+4})y + k_{-6}y \quad \text{Gl. 16b}$$

$$k_{+3}(a-w)(s-w) = k_{-3}w \quad \text{Gl. 16c}$$

Für Gl. 13 folgt:

$$k_{+1}s(e-x-y) + k_{-3}y = (k_{-1}+k_{+2})x + k_{+3}ax \quad \text{Gl. 17a}$$

$$k_{+5}as(e-x-y) + k_{+3}ax = (k_{-5}+k_{+4})y + k_{-3}y \quad \text{Gl. 17b}$$

Das Reaktionsschema Gl. 12 läßt sich auf den hier vorliegenden Fall nicht anwenden, da die Geschwindigkeitsgleichung nur für $a \gg s$ oder $s \gg a$ ersten Grades in bezug auf die totale Substratkonzentration (s) ist, wie Gl. 16c zeigt. Die Experimente wurden jedoch mit $a \gg s$ und $a \ll s$ durchgeführt, so daß Gl. 12 wegen der stets gefundenen Linearität zwischen e/v und $1/s$ hier nicht in Frage kommen kann.

Aus den Ansätzen Gl. 15 und Gl. 17 lassen sich die folgenden allgemeinen Geschwindigkeitsgleichungen ableiten. Dabei kann für die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionsschritte, die über einen Enzym-Substrat-Aktivator-Komplex (ESA) verlaufen (k_{+5} , k_{-5} , k_{+4}), wegen der Analogie der einzelnen Schritte (wie in den Gl. 11-13 bereits aufgeführt) gesetzt werden:

$$\begin{aligned} k_{+4} &= \alpha \cdot k_{+2} \\ k_{-5} &= \beta \cdot k_{-1} \\ k_{+5} &= \gamma \cdot k_{+1} \end{aligned} \quad \text{Gl. 18}$$

Damit lautet die Geschwindigkeitsgleichung für das Reaktionsschema Gl. 11

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{+2} \cdot [(\gamma k_{+3} a + k_{-3})(\alpha k_{+6} a + k_{-6}) + \alpha \gamma k_{+3} a (k_{-1} + k_{+2}) + k_{-3} (\beta k_{-1} + \alpha k_{+2})]}{N + \frac{k_{+3} a + k_{-3}}{k_{+1} \cdot s} \cdot [(\beta k_{-1} + \alpha k_{+2})(k_{-1} + k_{+2} + k_{+6} a) + (k_{-1} + k_{+2}) k_{-6}]}$$

Gl.19

$$N = (\gamma k_{+3} a + k_{-3})(k_{+6} a + k_{-6}) + \gamma k_{+3} a (k_{-1} + k_{+2}) + k_{-3} (\beta k_{-1} + \alpha k_{+2})$$

^{+) In Gl.13 würde k_{+5} die Konstante einer Reaktion dritter Ordnung sein.' Setzt man in Gl.13 deshalb $k_{+5} a = \gamma k_{+1}$, so ergibt sich dieselbe Interpretation wie mit Gl. 18.}

Die Geschwindigkeitsgleichung für das Reaktions-
schema Gl. 13 lautet:

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{+2}[(\beta k_{-1} + \alpha k_{+2}) + (\alpha k_{+3} a + k_{-3})(1 + \gamma a) + \alpha \gamma (k_{+1} + k_{+2}) a]}{N + \frac{1}{k_{+1} S} [(\beta k_{-1} + \alpha k_{+2})(k_{-1} + k_{+2} + k_{+3} a) + k_{-3}(k_{-1} + k_{+2})]} \quad \text{Gl. 20}$$

$$N = (\beta k_{-1} + \alpha k_{+2}) + \gamma (k_{-1} + k_{+2}) a + (k_{+3} a + k_{-3})(1 + \gamma a)$$

Unabhängig von der Interpretation der Konstanten k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} lassen sich aus Gl. 19 und Gl. 20 die Formeln für

$$\Phi = \frac{K^0}{K_m} \quad (\text{Gl. 8}) \quad \text{und} \quad \varphi = \frac{k^0}{k_{+2}} \quad (\text{Gl. 9})$$

ableiten, und die Bedingungen berechnen, unter denen Gl. 19 und Gl. 20 den experimentellen Befund $\Phi = \varphi$ erfüllen.

a. Reaktionsschema Gl. 11

Mit der allgemeinen Formulierung

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad \text{Gl. 4}$$

folgt aus Gl. 19 und Gl. 8 bzw. Gl. 9

$$\varphi = \frac{(\gamma k_{+3} a + k_{-3})(\alpha k_{+6} a + k_{-6}) + \alpha \gamma k_{+3} a (k_{-1} + k_{+2}) + k_{-3}(\beta k_{-1} + \alpha k_{+2})}{(\gamma k_{+3} a + k_{-3})(k_{+6} a + k_{-6}) + \gamma k_{+3} a (k_{-1} + k_{+2}) + k_{-3}(\beta k_{-1} + \alpha k_{+2})} \quad \text{Gl. 21}$$

$$K_m \cdot \Phi = \frac{(k_{+3}a + k_{-3})[(\beta k_{-1} + \alpha k_{+2})(k_{-1} + k_{+2} + k_{+6}a) + (k_{-1} + k_{+2})k_{-6}]}{[(\gamma k_{+3}a + k_{-3})(k_{+6}a + k_{-6}) + \gamma k_{+3}a(k_{-1} + k_{+2}) + k_{-3}(\beta k_{-1} + \alpha k_{+2})] \cdot k_{+1}} \quad \text{Gl. 22}$$

und es ist $K_m \cdot \Phi \neq K_m \cdot \varphi$.

Setzt man $K_m \cdot \Phi = K_m \cdot \varphi$, so folgt aus Gl. 21 und Gl. 22

$$\begin{aligned} & (k_{-1} + k_{+2})k_{+3}k_{-6}(\gamma - 1) + k_{+3}k_{-1}(k_{-1} + k_{+2} + k_{+6}a)(\alpha\gamma - \beta) + \\ & + k_{+6}k_{-3}k_{-1}(\alpha - \beta) + k_{+3}k_{+2}(k_{-1} + k_{+2} + k_{+6}a)\alpha(\gamma - 1) = 0 \end{aligned} \quad \text{Gl. 23}$$

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß $\varphi > 1$ ist und dann nach Gl. 21 $\alpha \neq 0$ sein muß, folgt aus Gl. 23

$$\begin{aligned} \gamma - 1 &= 0 \\ \alpha - \beta &= 0 \\ \alpha \cdot \gamma - \beta &= 0 \end{aligned}$$

und damit

$$\gamma = 1 \quad \text{Gl. 24}$$

$$\alpha = \beta \quad \text{Gl. 25}$$

Nun besteht die Möglichkeit, daß in Gl. 11 kein Gleichgewicht $ES + A \rightleftharpoons ESA$ vorliegt, d.h. $k_{+6} = 0$ und $k_{-6} = 0$ sind. Dann folgt aus Gl. 23 wiederum $\gamma = 1$ (Gl. 24) und $\alpha = \beta$ (Gl. 25).

Legt man das Postulat von Rabin, $k_{-1} \gg k_{+2}$ zugrunde, so wird Gl. 4 vereinfacht zu Gl. 7

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_s \quad \text{Gl. 7}$$

indem k_{+2} gegenüber k_{-1} in Gl. 19 vernachlässigt wird. Dann folgt aus Gl. 19

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{+2}[k_{-1}(\alpha\gamma k_{+3}a + \beta k_{-3}) + (\alpha k_{+6}a + k_{-6})(\gamma k_{+3}a + k_{-3})]}{[k_{-1}(\gamma k_{+3}a + \beta k_{-3}) + (k_{+6}a + k_{-6})(\gamma k_{+3}a + k_{-3})] + \frac{K_2}{S}(k_{+3}a + k_{-3})(\beta k_{-1} + \beta k_{+6}a + k_{-6})} \quad \text{Gl. 26}$$

$$\varphi = \frac{k_{-1}(\alpha\gamma k_{+3}a + \beta k_{-3}) + (\alpha k_{+6}a + k_{-6})(\gamma k_{+3}a + k_{-3})}{k_{-1}(\gamma k_{+3}a + \beta k_{-3}) + (k_{+6}a + k_{-6})(\gamma k_{+3}a + k_{-3})} \quad \text{Gl. 27}$$

$$\Phi = \frac{(k_{+3}a + k_{-3})(\beta k_{-1} + \beta k_{+6}a + k_{-6})}{k_{-1}(\gamma k_{+3}a + \beta k_{-3}) + (k_{+6}a + k_{-6})(\gamma k_{+3}a + k_{-3})} \quad \text{Gl. 28}$$

und es ist wiederum $\Phi \neq \varphi$. Setzt man $\Phi = \varphi$, so folgt aus Gl. 27 und Gl. 28

$$k_{+3}(k_{-1} + k_{+6}a)(\beta - \alpha\gamma) + k_{+3}k_{-6}(1 - \gamma) + k_{+6}k_{-3}(\beta - \alpha) = 0 \quad \text{Gl. 29}$$

und daraus erneut

$$\gamma = 1 \quad \text{Gl. 24}$$

$$\alpha = \beta \quad \text{Gl. 25}$$

Setzt man abermals $k_{+6} = 0$ und $k_{-6} = 0$, so folgt aus Gl. 29

$$\beta = \alpha \cdot \gamma \quad \text{Gl. 30}$$

Das sind die Bedingungen für die Parallelität.

b. Reaktionsschema Gl. 13

Analog läßt sich die Geschwindigkeitsgleichung Gl. 20 weiterentwickeln, ohne daß eine Interpretation der Konstanten k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} vorweggenommen wird. Mit

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad \text{Gl. 4}$$

folgt aus Gl. 20

$$\mathcal{S} = \frac{(\beta k_{-1} + \alpha k_{+2}) + \alpha \gamma (k_{-1} + k_{+2}) a + (\alpha k_{+3} a + k_{-3})(1 + \gamma a)}{(\beta k_{-1} + \alpha k_{+2}) + \gamma (k_{-1} + k_{+2}) a + (k_{+3} a + k_{-3})(1 + \gamma a)} \quad \text{Gl. 31}$$

$$K_m \cdot \Phi = \frac{(\beta k_{-1} + \alpha k_{+2})(k_{-1} + k_{+2} + k_{+3} a) + k_{-3}(k_{-1} + k_{+2})}{[(\beta k_{-1} + \alpha k_{+2}) + \gamma (k_{-1} + k_{+2}) a + (k_{+3} a + k_{-3})(1 + \gamma a)] k_{+1}} \quad \text{Gl. 32}$$

und es ist $K_m \cdot \Phi \neq K_m \cdot \mathcal{S}$. Aus Gl. 31 und Gl. 32 folgt für $K_m \cdot \Phi = K_m \cdot \mathcal{S}$

$$(k_{-1} + k_{+2})(k_{+3} a + k_{-1} + k_{+2}) \alpha \gamma + (k_{-1} + k_{+2}) k_{-3} \gamma + k_{+3} k_{-1} (\alpha - \beta) = 0 \quad \text{Gl. 33}$$

und da $\gamma > 1$ und $\alpha \neq 0$ sein müssen, ergibt sich

$$\gamma = 0 \quad \text{Gl. 34}$$

$$\alpha = \beta \quad \text{Gl. 25}$$

Wird Gl. 4 wieder vereinfacht zu Gl. 7 und k_{+2} gegenüber k_{-1} in Gl. 20 vernachlässigt, so folgt aus Gl. 20

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{+2} [k_{-1} (\beta + \alpha \gamma a) + (\alpha k_{+3} a + k_{-3})(1 + \gamma a)]}{[k_{-1} (\beta + \gamma a) + (k_{+3} a + k_{-3})(1 + \gamma a)] + \frac{K_S}{S} (\beta k_{-1} + \beta k_{+3} a + k_{-3})} \quad \text{Gl. 35}$$

$$\mathcal{S} = \frac{k_{-1} (\beta + \alpha \gamma a) + (\alpha k_{+3} a + k_{-3})(1 + \gamma a)}{k_{-1} (\beta + \gamma a) + (k_{+3} a + k_{-3})(1 + \gamma a)} \quad \text{Gl. 36}$$

$$\Phi = \frac{\beta k_{-1} + \beta k_{+3} a + k_{-3}}{k_{-1} (\beta + \gamma a) + (k_{+3} a + k_{-3})(1 + \gamma a)} \quad \text{Gl. 37}$$

Für $\Phi = \varphi$ wird aus Gl. 36 und Gl. 37

$$k_{+3}(\alpha - \beta) + (k_{+3}a + k_{-1})\alpha\gamma + k_{-3}\gamma = 0 \quad \text{Gl. 38}$$

und da $\varphi > 1$ und $\alpha \neq 0$ sein müssen, wird wieder

$$\gamma = 0 \quad \text{Gl. 34}$$

$$\alpha = \beta \quad \text{Gl. 25}$$

Das sind die Bedingungen für die Parallelität.

c. Zusammenfassung

Gleichgültig, ob man

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad (\text{Gl. 4}) \quad \text{oder} \quad K_m = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_s \quad (\text{Gl. 7})$$

definiert, lassen sich die experimentellen Befunde ($\Phi = \varphi$) nur dann erklären, wenn man in Reaktionsschema Gl. 13 setzt:

$$\alpha = \beta \quad \text{Gl. 25}$$

$$\gamma = 0 \quad \text{Gl. 34}$$

und damit

$$\Phi = \varphi = \frac{\alpha \cdot k_{+3} \cdot a + \alpha(k_{-1} + k_{+2}) + k_{-3}}{k_{+3}a + \alpha(k_{-1} + k_{+2}) + k_{-3}} \quad \text{Gl. 39}$$

Für Reaktionsschema Gl. 11 gilt:

$$\alpha = \beta \quad \text{Gl. 25}$$

$$\gamma = 1 \quad \text{Gl. 24}$$

und damit

$$\varphi = \Phi = \frac{[\alpha \cdot (k_{-1} + k_{+2}) + \alpha k_{+6}a + k_{-6}] \cdot [k_{+3}a + k_{-3}]}{(k_{-1} + k_{+2})(k_{+3}a + \alpha k_{-3}) + (k_{+6}a + k_{-6})(k_{+3}a + k_{-3})} \quad \text{Gl. 40}$$

Lediglich mit $k_{+6} = k_{-6} = 0$ und $K_S = k_{-1}/k_{+1}$ folgt
für Gl. 11: $\beta = \alpha \cdot \gamma$ Gl. 30

Diese Ableitungen gelten allgemein für Modifizierer,
und je nach Größe des experimentell ermittelten
Faktors φ folgt:

$\varphi > 1 \longrightarrow \alpha > 1$: der Modifizierer ist ein Aktivator,

$\varphi < 1 \longrightarrow \alpha < 1$: der Modifizierer ist ein Inhibitor.

IV. Interpretation der Konstanten k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} , K_m

Nach den vorangegangenen theoretischen Ableitungen,
die unabhängig von jedem Reaktionsmechanismus gültig
sind, lassen sich die im $e/v-1/s$ -Diagramm gefundenen
Parallelen nur mit Hilfe von Gl.24, Gl.25, Gl.30
und Gl.34 erklären.

Aus Gl.25 und Gl.18 folgt ⁺⁾

$$\alpha = \frac{k_{+4}}{k_{+2}} = \frac{k_{-5}}{k_{-1}}$$

$$\frac{k_{+2}}{k_{-1}} = \frac{k_{+4}}{k_{-5}} \quad \text{Gl. 41}$$

⁺⁾ Gl. 30 ($\beta = \alpha \cdot \gamma$) führt zu denselben Schluß-
folgerungen.

Das bedeutet, daß der Aktivator beide Zerfallsschritte (k_{-1}, k_{+2}) gleichermaßen beeinflusst. Wären nun k_{-1} und k_{+2} Geschwindigkeitskonstanten zweier Reaktionsprozesse verschiedenen Typs, so stellten deren gleichartige Beeinflussungen durch einen Modifizierer einen Zufall dar, der nach Morales (6) ausgeschlossen werden kann, wenn verschiedene Modifizierer denselben Effekt bewirken.

Die Experimente zeigen aber die gleiche unkompetitive Aktivierung nicht nur mit verschiedenen Aktivatoren, sondern auch mit verschiedenen Substraten $-Cp(c)$, $Up(c)$ - und darüber hinaus vor allem auch bei verschiedenen pH-Werten, obgleich K_M und k_{+2} unterschiedliche pH-Abhängigkeiten aufweisen (10, 12).

Demzufolge müssen k_{-1} und k_{+2} Geschwindigkeitskonstanten für Reaktionsschritte gleichen Reaktionstyps, d.h. gekoppelte Konstanten, sein.

Wäre nun k_{-1} Teilkonstante eines Enzym-Substrat-Gleichgewichtes, d.h. die Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion, in deren Verlauf nur eine Dissoziation erfolgt, so müßte der Schritt k_{+2} ebenfalls nur aus einer solchen Dissoziation bestehen. Dafür käme lediglich die Lösung des Produkts vom Enzym in Frage, da ausschließlich hier analoge Bindungskräfte und Bindungsstellen betroffen sind.

Die Untersuchungen von Hammes (8) haben aber ergeben, daß die Geschwindigkeitskonstante für die Lösung des Produkts ($3'-Cp$) vom Enzym ca. 1000mal größer ist als der k_{+2} -Wert von $Cp(c)$.

Demnach muß k_{+2} die Reaktionskonstante eines Schritts sein, in dessen Verlauf die Bindungen des Produkts ausgebildet werden.

Da nun der Schritt k_{-1} nach demselben Reaktionstyp bzw. Katalyseprinzip ablaufen muß wie k_{+2} , kann k_{-1} nicht die Dissoziationskonstante eines Enzym-Substrat-Komplexes sein, sondern muß ebenfalls einen Schritt wiedergeben, in dessen Verlauf Bindungswechsel erfolgen. Mit den Schritten k_{-1} und k_{+2} müssen danach aus identischen oder analogen "Ausgangsverbindungen" zwei verschiedene "Produkte" entstehen, von denen eines mit dem Substrat identisch ist.

Das bedeutet also, daß im Verlauf der Reaktion mit Hilfe des Enzyms ein Zwischenzustand aufgebaut wird, der entweder rückläufig wieder zum Substrat umgesetzt wird (k_{-1}) oder weiter zum Produkt reagiert (k_{+2}). - Dieser Zwischenzustand wird im folgenden mit EZ bezeichnet, um Verwechslungen mit dem Enzym-Substrat-Komplex (ES) zu vermeiden.

Daraus folgt, daß k_{+1} eine Konstante sein muß, welche die kinetischen Verhältnisse wiedergibt, durch die die Bildung dieses Zwischenzustands gesteuert wird.

Eine Entscheidung darüber, ob k_{+1} nur die Gegenreaktion zu k_{-1} darstellt, also ebenfalls einen Schritt, in dessen Verlauf ausschließlich Bindungswechsel erfolgen, ob k_{+1} andererseits nur die Bildungskonstante in einem vorgelagerten Gleichgewicht (z.B. zwischen E und S) darstellt oder ob beides in k_{+1} enthalten ist, läßt sich nicht auf Grund dieser mathematischen Ableitungen fällen. Denn Gl. 24 ($\gamma = 1$ in Schema Gl. 11) bzw. Gl. 34 ($\gamma = 0$ in Schema Gl. 13) gestatten keine derartigen Rückschlüsse auf k_{+1} , sondern nur auf den später zu diskutierenden Mechanismus der unkompetitiven Aktivierung.

Bezüglich K_m resultiert daraus: Da k_{-1} und k_{+2} keine Konstanten von Enzym-Substrat-Gleichgewichten sind, kann auch K_m nicht die Dissoziationskonstante eines Enzym-Substrat-Komplexes sein, sondern es muß gelten:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

$$= \frac{\text{Summe der Zerfallskonstanten des Zwischenzustands EZ}}{\text{Summe der Bildungskonstanten des Zwischenzustands EZ}}$$

Da sowohl $Cp(c)$ als auch $Up(c)$ durch Adenosin unkompetitiv aktiviert werden, muß diese Kopplung von k_{-1} und k_{+2} stets gewährleistet sein, wenn nur die Pyrimidinbase verändert wird. Deshalb muß sich jede bei k_{+2} beobachtete Änderung gleichermaßen auf k_{-1} auswirken, gleichgültig, welches Verhältnis zwischen k_{-1} und k_{+2} besteht, solange die Variation von k_{+2} nur auf einer Veränderung der Pyrimidinbase beruht.

Das gestattet weitere Ueberlegungen zur Bedeutung von k_{+1} : Da die k_{+2} -Werte der Dinucleosidphosphate stets im Verhältnis $CpR : UpR \approx Cp(c) : Up(c)$ stehen (10) und bei der unkompetitiven Aktivierung das Verhältnis $CpA : UpA \approx Cp(c) + A : Up(c) + A \approx Cp(c) : Up(c)$ gefunden wurde, läßt sich diese Kopplung von k_{-1} und k_{+2} auch auf die Dinucleosidphosphate übertragen. Deren k_{+2} -Werte sind um zwei bis vier Zehnerpotenzen größer als die der entsprechenden Nucleotid-alkylester, während die K_m -werte konstant sind. Da sich k_{-1} ebenso wie k_{+2}

geändert hat, kann K_m nur konstant bleiben, wenn bei dieser "intramolekularen Aktivierung" auch k_{+1} um denselben Faktor erhöht ist. Das kann aber wiederum nur erfolgen, wenn sich die Geschwindigkeitskonstante eines Reaktionsschritts verändert hat, in dessen Verlauf, wie bei k_{+2} und k_{-1} , Bindungswechsel stattfinden.

Daraus folgt: Die Geschwindigkeit der Bildung des Zwischenzustands (k_{+1}) wird bestimmt durch die Umformung der Bindungen des Substratmoleküls in die des Zwischenzustands.

Ob und in welchem Ausmaß vorgelagerte Gleichgewichte, die nicht kinetisch gesondert zu erfassen sind, den Wert von k_{+1} noch beeinflussen, kann nur an Hand eines Reaktionsmechanismus beurteilt werden. Dies wird in einem späteren Abschnitt diskutiert, wenn die Grundzüge des Mechanismus der RNase-Reaktion gemäß dieser Zuordnung der Parameter aufgestellt sind.

Zusammengefaßt ergeben sich aus der Diskussion folgende Punkte, die als Mindestforderungen der Aufstellung eines Reaktionsmechanismus zugrunde liegen müssen:

- a. Im Verlauf der Reaktion wird ein Zwischenzustand aufgebaut, dessen Bildung und Zerfall geschwindigkeitsbestimmend sind.
- b. k_{+1} repräsentiert die Bildung von EZ aus S und E, k_{-1} den Zerfall von EZ zu S und E, k_{+2} den Zerfall von EZ zu E und P.
- c. K_m gibt das Verhältnis der Summe der Zerfallskonstanten zur Summe der Bildungskonstanten wieder.

- d. k_{-1} und k_{+2} sind gekoppelte Konstanten, d.h. beide Zerfallsreaktionen müssen nach demselben Mechanismus ablaufen. Das Verhältnis von k_{-1} zu k_{+2} ist für K_m deshalb unerheblich.
- e. Jeder der kinetisch wirksamen Schritte $S \rightarrow EZ$, $EZ \rightarrow S$, $EZ \rightarrow P$ muß unter Lösung und Knüpfung von homöopolaren Bindungen erfolgen. Welche Bindungen davon betroffen sind, muß aus der Struktur von Substraten, Produkten und den notwendigen Ubergangszuständen sowie dem Beitrag des Enzyms zur Herabsetzung der Aktivierungsenergien ermittelt werden.

Es erhebt sich nun die Frage, inwieweit diese Bedingungen von den zur Diskussion stehenden Reaktionsmechanismen erfüllt werden.

Nach dem Mechanismus von Rabin (4) soll die Reaktion durch simultane Protonenübertragungen zwischen der Phosphatgruppe, der C-2'-OH-Gruppe und zwei Histidinresten der RNase katalysiert werden (Abb. 5).

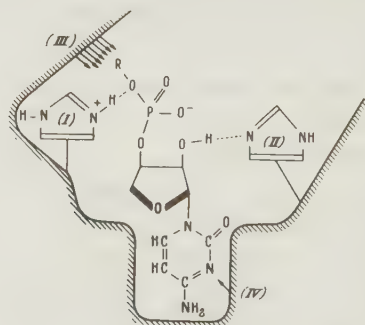


Abb. 5 (aus (4) entnommen)

Danach soll bei der Umwandlung zum Produkt lediglich ein Uebergangszustand durchlaufen werden, was einen Kinetiktyp bedingt, in den ein Enzym-Substrat-Komplex eingeht; und die Spezifität der RNase für Ester der 3'-Pyrimidinnucleotide muß dann zwangsläufig aus einer Bindung des Heterocyclus am Enzym erklärt werden. Dementsprechend können in diesem Mechanismus die Konstanten k_{-1} und k_{+2} nicht gekoppelt sein, wie nach unseren Ergebnissen gefordert werden muß.

Daraus folgt: der Mechanismus von Rabin ist in keiner Variante, nicht einmal durch neue Zusatzpostulate, mit den Befunden und der daraus resultierenden Interpretation der kinetischen Parameter in Einklang zu bringen.

Demgegenüber enthält der Mechanismus von Witzel (10) alle hier abgeleiteten Forderungen.

V. Der Mechanismus der RNase-Reaktion

Eingehende Untersuchungen von Witzel (10) und Gassen (13) über die spezifischen Strukturmerkmale der Substrate haben ergeben, daß die Pyrimidinbase nicht an einer Bindung zwischen Substrat und RNase sondern direkt an der Katalyse beteiligt ist, in der die Spezifität der RNase begründet liegt. Voraussetzung für diese Katalyse ist eine sterisch fixierte Lage zwischen der C-2'-OH-Gruppe und dem C-2-Sauerstoff und dessen Verknüpfung mit einem

mesomeren oder durch Tautomerie stabilisierbaren System.

Ferner konnte nachgewiesen werden, daß der Angriff des Enzyms nur an der Phosphatgruppe erfolgt und daß die katalytische Wirkung der RNase lediglich in einer Erhöhung der Elektrophilie des Phosphors besteht.

Aus diesen Befunden und der obigen Zuordnung der kinetischen Parameter ergibt sich der folgende Reaktionsmechanismus (Abb. 6). - Zur besseren Uebersicht wurde in Abb. 6 auf eine sterisch richtige Wiedergabe verzichtet (die C-2'-OH-Gruppe ist transständig zur Pyrimidinbase); die hier dargestellten Beziehungen der einzelnen Gruppen zueinander lassen sich aus Modellen entnehmen und konnten an Hand des Cotton-Effekts durch ORD-Messungen von Ulbricht (14) bestätigt werden.

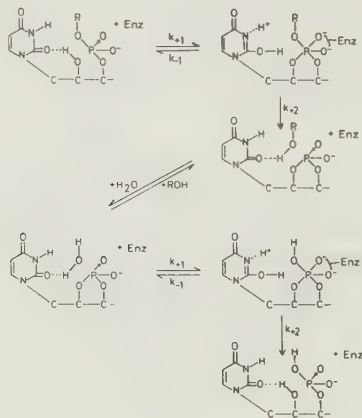


Abb. 6

Danach setzt sich die Reaktion aus der basenkatalysierten Bildung (k_{+1}) und dem säurekatalysierten Zerfall (k_{-1}, k_{+2}) eines enzymstabilisierten Zwischenzustands (EZ) zusammen.

Die Bildung von EZ erfolgt durch Uebernahme eines Protons vom angreifenden Nucleophil -im ersten Schritt von der C-2'-OH-Gruppe, im zweiten Schritt von einem Wassermolekül- durch den C-2-Sauerstoff des Heterocyclus, Ausbildung eines pentakovalenten Phosphors durch den Angriff des C-2'-Sauerstoffs und Stabilisierung dieser Phosphatgruppe durch die RNase. - Der Zerfall von EZ erfolgt durch eine Säurekatalyse, indem das Proton vom C-2-Sauerstoff des Heterocyclus auf eines der beiden Sauerstoffatome der P-O-C-2'-Bindung oder der P-O-R(H)-Bindung übertragen wird.

Die Geschwindigkeiten für Bildung und Zerfall des enzymstabilisierten Zwischenzustands hängen weniger von der Basizität oder Acidität des Heterocyclus ab, als vielmehr von seiner Polarisierbarkeit oder den Aktivierungsenergien für die Uebergänge in ihre tautomeren Formen (10, 13).

Da der Zerfall von EZ in beiden Richtungen durch die gleiche Säure katalysiert wird, sind k_{-1} und k_{+2} zwangsläufig gekoppelte Konstanten, deren Verhältnis durch die Nucleophilie der angegriffenen Sauerstoffatome in den beiden Esterbindungen bestimmt wird. Eine Veränderung der katalysierenden Pyrimidinbase wirkt sich demgemäß nicht auf das Verhältnis von $k_{-1} : k_{+2}$ aus.

War es in den vorangegangenen Abschnitten nur möglich, festzustellen, daß k_{+1} in erster Linie eine Reaktionskonstante ist, die evtl. kinetisch

nicht erfaßbare vorgelagerte Gleichgewichte enthält, so kann jetzt endgültig die Natur der Konstanten k_{+1} festgelegt werden:

Die RNase-Reaktion wird nicht gehemmt durch Diester von Purinnucleotiden wie ApA und Ap(c) (s. S. 8,9), während 3'-Ap ein Inhibitor ist. Diese Diester sollten aber über ihre substratanaloge Phosphatgruppe mit der RNase in entsprechende Wechselwirkung wie die Substrate treten können. Wenn dennoch keine Bindung zu einem Komplex erfolgt, so deshalb, weil nicht die Wechselwirkung zwischen RNase und Phosphatgruppe zur Bildung von EZ führt, sondern weil eine Bindung der RNase nur dann erfolgt, wenn die Pyrimidinbase ihrerseits die Reaktion gleichzeitig katalysiert. Somit repräsentiert k_{+1} die Aktivierungsenergien, die aufgebracht werden müssen zur Uebernahme des Protons und dem Angriff des Sauerstoffs am Phosphor einerseits und der gleichzeitigen Stabilisierung der Phosphatgruppe mit pentakovalentem Phosphor andererseits.

Im Einklang mit dieser Interpretation steht die Beobachtung von Hammes (8), daß 2'-Cp und 3'-Cp in einer sehr schnellen Wechselwirkung mit der RNase stehen, so daß die Zahl der Zusammenstöße zwischen der RNase und der Phosphatgruppe nicht die limitierende Größe bei der Bildung des enzymstabilisierten Zwischenzustands sein kann.

Eine Veränderung des Heterocyclus muß sich dementsprechend in Verschiebungen der kinetischen Parameter widerspiegeln, je nachdem, wie beide Katalysenfunktionen betroffen werden:

- a. Wird nur die Basenkatalyse verändert, so resultiert eine Aenderung von K_m , während k_{+2} konstant bleibt (kompetitiver Typ).
- b. Wird nur die Säurekatalyse verändert, so resultiert eine Aenderung von K_m und k_{+2} um denselben Faktor (unkompetitiver Typ).
- c. Werden beide Katalyseprinzipien entgegengesetzt verändert, so resultieren gleichsinnige Aenderungen von k_{+2} und K_m , jedoch wird K_m stets stärker betroffen.
- d. Werden beide Katalyseprinzipien gleichsinnig und in gleichem Ausmaß betroffen, so resultiert eine Aenderung von k_{+2} , während K_m unverändert bleibt. Ein solcher nicht-kompetitiver Typ kann auftreten, wenn die Aktivierungsenergien für die Uebergänge der Pyrimidinbase in ihre tautomeren Formen verändert werden. Dieser Fall wird in Kapitel C an Hand der Dinucleosidphosphate ausführlich diskutiert.
- e. Sind beide Katalyseprinzipien gleichsinnig, aber in verschiedenem Ausmaß betroffen, so resultieren unterschiedliche Aenderungen von k_{+2} und K_m .

VI. Zum Verhältnis $k_{-1} : k_{+2}$

Obgleich das Verhältnis $k_{-1} : k_{+2}$ für die Interpretation der Parameter unerheblich ist, wurden Versuche unternommen, auch dieses Verhältnis abzuschätzen.

Ersetzt man bei Substraten des ersten Schritts die abzuspaltende Alkoholgruppe (OR) durch einen stärker elektronenziehenden Rest (OR'), dann wird die Energie zur Spaltung dieser Esterbindung entsprechend herabgesetzt. Das Verhältnis $k_{-1} : k_{+2}$ verändert sich dadurch zugunsten von k_{+2} ; und durch die erhöhte Elektrophilie am Phosphor kann k_{+1} nur ansteigen. Wäre k_{-1} wesentlich größer als k_{+2} , dann dürfte sich in K_m nur dieser Anstieg von k_{+1} bemerkbar machen, d.h. K_m müßte abfallen.

Wäre jedoch k_{-1} bei den normalen Substraten (OR) in der Größenordnung von k_{+2} , dann sollte bei Einführung von OR' k_{+2} wesentlich größer werden als k_{-1} , und somit, trotz der Erhöhung von k_{+1} , ein Anstieg von K_m resultieren.

Das wurde von uns am Naphthylester der Uridylsäure geprüft, dessen Umesterungsgeschwindigkeit um einen Faktor 80 größer ist als die des Benzylesters. Die Konstanten sind in Tab. 4 zusammengestellt (15).

Substrat	K_m ($10^{-3} M$)	k_{+2} (sec^{-1})
Up-benzyl	5	1
Up-naphthyl	25	400

Tab. 4

Nach der obigen Ueberlegung bedeutet das aber, daß k_{+2} beim Up-naphthyl wesentlich größer ist als k_{-1} . Wenn aber eine Erhöhung von k_{+2} um einen Faktor 400 bereits zu $k_{+2} \gg k_{-1}$ führt, kann unmöglich bei einer Steigerung von k_{+2} um einen Faktor 1000 - 5000 (Dinucleosidphosphate) $k_{-1} \gg k_{+2}$ sein.

Da andererseits für cyclische Diester der Fall $k_{+2} \gg k_{-1}$ ausgeschlossen werden konnte (s. S. 12), folgt aus diesen Versuchen, daß bei cyclischen Diestern und Nucleotid-alkylestern k_{-1} und k_{+2} etwa gleiche Größenordnungen aufweisen.

Damit ist wiederum die Annahme, daß K_m als k_{-1}/k_{+1} behandelt werden darf, nicht gerechtfertigt.

VII. Schlusfolgerungen

Die unkompetitive Aktivierung ⁺⁾ der RNase-Reaktion durch Adeninderivate und ihre theoretische Behandlung lieferten die Möglichkeit, die kinetischen Parameter, unabhängig von Vorstellungen über den Reaktionsmechanismus, der Bildung und dem Zerfall eines enzymstabilisierten Zwischenzustands zuzuordnen und die Kopplung der beiden Zerfallskonstanten k_{-1} und k_{+2} nachzuweisen.

Dadurch konnten ein bereits aus anderen Argumenten abgeleiteter Mechanismus -Witzel (10)- gestützt und ein anderer -Rabin (4)- verworfen werden und

⁺⁾ Der Mechanismus der unkompetitiven Aktivierung wird zweckmäßig erst in einem späteren Kapitel diskutiert.

die Diskrepanzen in der Interpretation der Kinetiken beseitigt werden.

Bisher wurde die Wirkungsweise von Enzymen stets nur nach Vorstellungen interpretiert, wie sie von Henri (16) und Michaelis-Menten (2) entwickelt worden sind. Darauf basiert auch der Mechanismus von Rabin.

Hier wurde aber am Beispiel der RNase gezeigt, daß nicht alle Enzym-Reaktionen mit der Ausbildung eines Enzym-Substrat-Gleichgewichtes eingeleitet werden müssen und daß dessen Geschwindigkeiten nicht unbedingt in die Reaktionsgeschwindigkeit eingehen. Ferner konnte gezeigt werden, daß zwei Schritte einer Enzym-Reaktion, nämlich die Bildung des Produkts und die Rückbildung des Substrats, durch das gleiche Katalyseprinzip gekoppelt ablaufen können.

Da es durch Verfeinerung der Meßmethoden, insbesondere durch die Relaxationszeitmessungen in Verbindung mit stopped-flow-Methoden (17), in absehbarer Zeit möglich werden wird, auch von komplexeren Reaktionen die Konstanten einzeln zu erfassen, können für die Aufstellung vernünftiger Reaktionsmechanismen nicht ausschließlich die Michaelis-Menten-Theorie (2) und die auf ihr basierenden Weiterentwicklungen (3, 18, 19 - Übersicht: 20) zugrunde gelegt werden, sondern es müssen auch andere Interpretationsmöglichkeiten, wie die hier aufgezeigten, in Betracht gezogen werden.

B. Weitere Untersuchungen zur Natur der unkompetitiven Aktivierung

Die im vorigen Kapitel aufgeführten Experimente sind völlig ausreichend für das dort behandelte Problem. Es lassen sich jedoch noch keine Aussagen über die Natur der unkompetitiven Aktivierung machen. Hierzu sind weitere Untersuchungen durchgeführt worden.

a. Naturgemäß sollte die Reaktionsgeschwindigkeit von der Aktivatorkonzentration (a) abhängen. Das wurde für Cp(c) und Adenosin bei pH 7,0 und 25°C untersucht: in Abb. 7 ist der Faktor der Aktivierung φ in Abhängigkeit von a wiedergegeben, die kinetischen Konstanten sind in Tab. 5 zusammengestellt +).

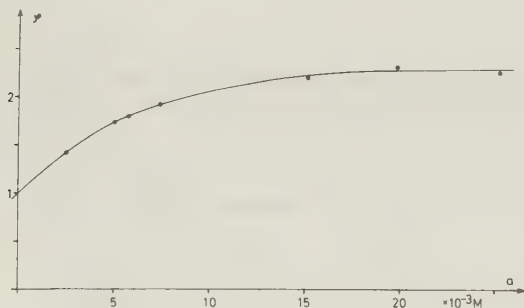


Abb. 7

+) Da die $e/v-1/s$ -Diagramme mit steigender Konzentration unübersichtlicher werden, sind sie hier nicht aufgeführt.

$a \text{ (} 10^{-3} \text{M)}$	$\Phi = \%$
0	1,00
2,5	1,42
5,0	1,73
5,8	1,80
7,4	1,92
15,2	2,20
19,9	2,31
25,3	2,26

Tab. 5 pH 7,0 - 25°C
in 0,2M NaCl

Wie Abb. 7 zeigt, steigt der Faktor der Aktivierung mit steigender Aktivatorkonzentration an, erreicht jedoch einen Sättigungswert $\%_{\max} = 2,3$ bei einer relativ zu den Substraten niedrigen Aktivatorkonzentration.

b. Die Temperaturabhängigkeit der unkompetitiven Aktivierung wurde ebenfalls für Cp(c) und Adenosin untersucht.

Abb. 8 gibt die erhaltenen $e/v-1/s$ -Diagramme wieder, deren Ergebnisse in Tab. 6 zusammengestellt sind.

Wie aus Abb. 9 hervorgeht, steigen beim Cp(c) $\log K_m$ und $\log k_{+2}$ mit der Temperatur im Bereich 20-45°C linear an. Hingegen zeigen die Parameter $\log K^0$ und $\log k^0$ für die aktivierte Reaktion eine nicht lineare Abhängigkeit, indem die Konstanten sich bei höherer Temperatur denen der nicht aktivierten Reaktion annähern.

T (°C)	Zusatz	$\bar{b}$ (10^{-6} Msec)	K^0 (10^{-3} M)	k^0 (sec^{-1})	Φ	φ
20	ohne	6,9	2,7	6,5		
20	mit	6,9	4,6	11,0	1,69	1,69
25	ohne	7,9	3,5	7,3		
25	mit	7,9	6,7	14,0	1,92	1,92
35	ohne	11,6	6,0	8,7		
35	mit	11,3	8,5	12,5	1,41	1,44
45	ohne	18,8	10,8	9,7		
45	mit	16,5	10,8	11,0	1,00	1,14

Tab. 6 pH 7,0 - in 0,2M NaCl
Zusatz: $7,4 \cdot 10^{-3}$ M Adenosin

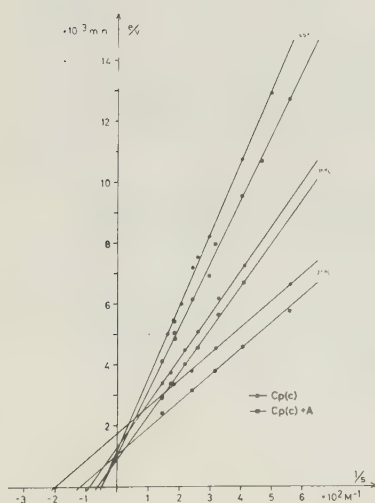


Abb. 8

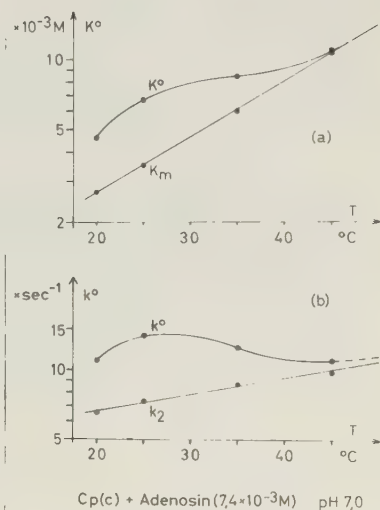


Abb. 9

c. Da Ukita (21) festgestellt hatte, daß Adenylsäuren kompetitive Inhibitoren sind, wurden auch diese Modifizierer untersucht. Die Abb. 10 u. 11 zeigen die erhaltenen e/v - $1/s$ -Diagramme, deren Ergebnisse in Tab. 7 zusammengestellt sind.

Zusatz	K^0 ($10^{-3}M$)	k^0 (sec^{-1})	$\bar{\Phi}$	ψ
ohne	3,5	7,3	1,00	1,00
2'-Ap $4,6 \cdot 10^{-4}M$	4,9	8,3	1,41	1,15
3'-Ap $4,4 \cdot 10^{-4}M$	5,2	9,4	1,50	1,28
5'-Ap $5,3 \cdot 10^{-4}M$	5,2	8,4	1,50	1,13
5'-Ap $8,6 \cdot 10^{-4}M$	6,0	9,0	1,75	1,24
ATP $4,3 \cdot 10^{-4}M$	11,2	8,5	3,24	1,17

Tab. 7 pH 7,0 - 25°C - I = 0,2M
in Dimethylglutarsäure/Tris-Puffer

Abb. 10 und Abb. 11 zeigen, daß bei diesen Modifizierern sowohl eine Aktivierung ($\psi > 1$) als auch eine Hemmung ($\bar{\Phi} > \psi > 1$) auftritt, so daß ein gemischter Kinetiktyp entsteht. Deshalb kann eine Berechnung der K_1 -Werte auch erst erfolgen, wenn ein Mechanismus für die Aktivierung abgeleitet worden ist.

Abb. 10

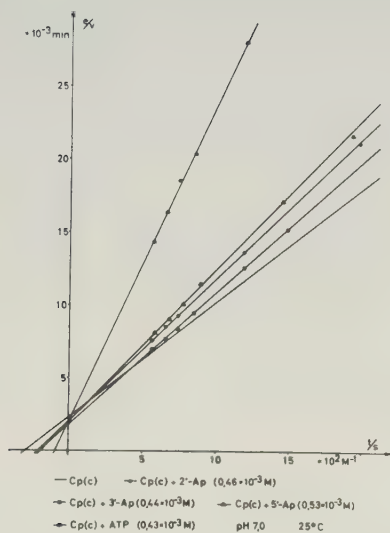
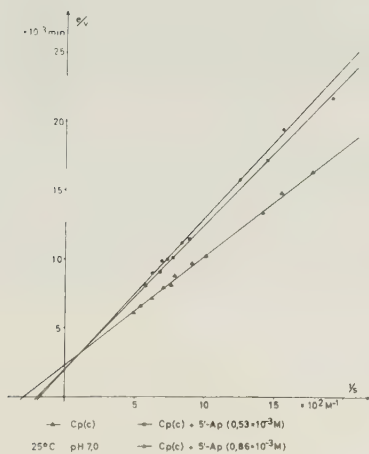


Abb. 11



d. Anderer Art ist der Einfluß von Adenosin auf Substrate des ersten Schritts der RNase-Reaktion: so wird die Umesterung von CpA zu Cp(c) durch Adenosin nicht-kompetitiv gehemmt (Abb.12, Tab,8).

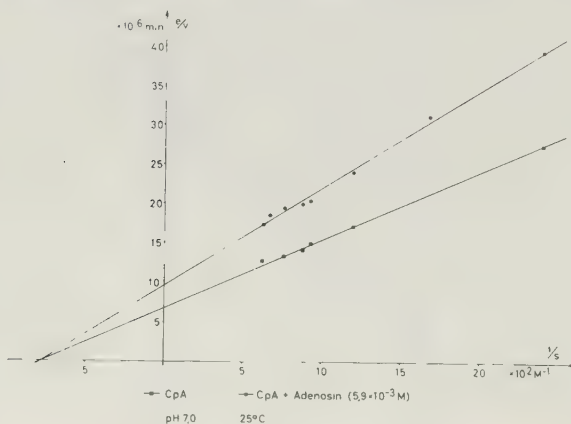


Abb. 12

Zusatz	K^0 (10^{-3} M)	k^0 (sec^{-1})
ohne	1,3	2490
mit	1,3	1740

Tab. 8 pH 7,0 - 25°C - I = 0,2M
 in Dimethylglutars./Tris-Puffer
 Zusatz: $5,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ Adenosin

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß nur der Adeninring für die Aktivierung der Hydrolyse von Cp(c) und Up(c) verantwortlich ist. Weder die Einführung des Riboserestes, noch die Einführung einer Phosphorsäurediestergruppe haben Einfluß auf den Aktivierungstyp.

Die Einführung einer Phosphorsäuremonoestergruppe führt zu einem gemischten Kinetiktyp. Diese Modifizierer zeigen neben der Aktivierung auch noch eine Hemmung.

Hingegen wird die Stärke der Aktivierung durch Veränderungen des Elektronensystems des Heterocyclus (Adenosin-N-1-oxid) beträchtlich beeinflusst.

Von besonderem Interesse ist jetzt, wie sich die unkompetitive Aktivierung in den im vorigen Kapitel beschriebenen Mechanismus einordnet, vor allem, ob und welche Analogien zwischen den Prinzipien dieser diffusionskontrollierten Aktivierung und der viel diskutierten aber noch nicht geklärten intramolekularen Aktivierung, wie sie bei Dinucleosidphosphaten gefunden wurde, bestehen. Ähnlichkeiten in der Temperaturabhängigkeit und die Existenz einer Sättigung bei relativ niedriger Aktivatorkonzentration weisen auf Zusammenhänge hin.

Es erschien mir deshalb notwendig, vor einer weiteren Diskussion über den Mechanismus der unkompetitiven Aktivierung, Experimente durchzuführen, die über die Art der intramolekularen Aktivierung bei Dinucleosidphosphaten Auskunft geben können.

C. Der Einfluß von Seiten der zweiten Esterkomponente in Dinucleosidphosphaten

I. Problemstellung

Der erste Schritt der RNase-Reaktion, die Umesterung von 3'-Nucleotidestern in 2',3'-cyclische Diester (Abb.6), verläuft nach denselben Prinzipien wie der im Kapitel A behandelte zweite Schritt. Denn es wurde gefunden, daß bei einer Alkoholyse statt einer Hydrolyse aus cyclischen Diestern 3'-Nucleotid-alkylester entstehen, also die Substrate des ersten Schritts (7, 11). Die reversiblen Umesterungen müssen dann nach einem der Hydrolyse analogen Mechanismus verlaufen (46).

Somit können alle Erkenntnisse über die Katalyse, die Substratspezifität und den Mechanismus, die in Untersuchungen über den zweiten Schritt gewonnen wurden, auf den ersten Schritt übertragen werden, vor allem die Bedeutung und Zuordnung der kinetischen Parameter.

Bei allen bisherigen Untersuchungen über die Umesterung von 3'-Nucleotidestern wurde gefunden, daß die K_m -Werte praktisch konstant und gleich denen der cyclischen Diester sind ($K_m = 1-6 \cdot 10^{-3} M$ bei 25°C, pH 7,0). Hingegen liegen die k_{+2} -Werte der Dinucleosidphosphate je nach der Natur der zweiten Esterkomponente um einen Faktor 10 - 6000 höher als die der Nucleotid-alkylester und cyclischen Diester, beide mit etwa gleichen k_{+2} -Werten (10).

Dieser Faktor steigt in der Reihenfolge U - C - G - A beträchtlich an und ist bei allen bisher untersuchten Substraten unabhängig von der Natur des 3'-Nucleotids.

Nach den vorangegangenen Ueberlegungen bedeutet das: bei den Dinucleosidphosphaten sind Säure- und Basenkatalyse um denselben Faktor erhöht (siehe nicht-kompetitiver Typ, Seite 31).

Als Grund für die starken Erhöhungen der k_{+2} -Werte müssen folgende Effekte in Betracht gezogen werden:

a. Änderungen der Elektronendichte an der Phosphatgruppe. - Dieser Effekt kann aber von vornherein ausgeschlossen werden, da in den Dinucleosidphosphaten die Phosphatgruppe stets mit dem C-5'-Sauerstoff der Ribose verestert ist, d.h. der Einfluß des 5'-Nucleosids nicht von der Natur der Base abhängig sein könnte.

b. Zusätzliche Bindung des 5'-Nucleosids an der RNase und sterische Orientierung am Reaktionsort, wie von Rabin (4) diskutiert wird.

c. Lokalisierte Wechselwirkungen zwischen den beiden Heterocyclen über Wasserstoffbrücken.

d. Erniedrigung der Aktivierungsenergien für die Uebergänge in der Pyrimidinbase durch π -Wechselwirkungen zwischen den Heterocyclen, wie von Witzel (9) diskutiert wird.

e. Durch die Wechselwirkung zwischen den Basen bedingte sterische Orientierung am Reaktionsort.

II. Kinetische Untersuchungen

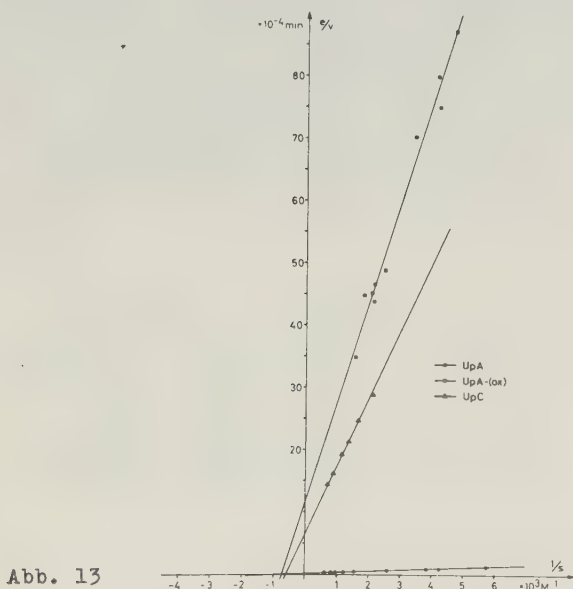
1. Substitutionen an der Base des 5'-Nucleosids, die nur sterische Einflüsse hervorrufen können, und Substitutionen, die außerdem Veränderungen am π -Elektronensystem bewirken, sollten geeignet sein, die Natur intramolekularer Wechselwirkungen zu klären. Zu diesem Zweck wurde der Einfluß einer Methylgruppe am N-3 des Uridins am Beispiel des CpU-N-3-Methyl und der Einfluß von N-Oxiden am Beispiel des UpA-N-1-oxids und des UpC-N-3-oxids untersucht. Die Darstellung dieser Substrate erfolgte aus den entsprechenden Dinucleosidphosphaten nach abgewandelten Verfahren von Brimacombe et. al. (22) und Cramer (23, 24) (s. exper. Teil).

In Tab. 9 sind die kinetischen Daten dieser Dinucleosidphosphate zusammengestellt; zum Vergleich wurden Up(c) und UpU ebenfalls aufgeführt.

Substrat	K_m ($10^{-3}M$)	k_{+2} (sec^{-1})
UpA	1,0	925
UpA-N-1-oxid	1,4	14
UpC	1,7	26
UpC-N-3-oxid	+	1,5-2,0
Up(c)	3,6	1,4
UpU ++)	3,7	11

Tab. 9 pH 7,0 - 25°C - I = 0,2 M
in Dimethylglutarsäure/NaOH-Puffer.
+) Wie bei UpC angenommen (s.exper. Teil)
++) In Imidazol-Puffer, 26°C (10)

Da diese Messungen als einzige in dieser Arbeit mit einer RNase-Präparation durchgeführt wurden, die nicht besonders gereinigt wurde (s. exper. Teil), sind die Werte für Up(c) in Tab.9 und Tab.3 bzw. für UpA in Tab.9 und Tab.10 nicht identisch. Die e/v-l/s-Diagramme von UpC, UpA und UpA-N-l-oxid sind in Abb. 13 wiedergegeben ⁺⁾ :



⁺⁾ Für die Ermittlung der Konstanten wurde beim UpA natürlich ein Diagramm mit günstigerem Auftragsmodus herangezogen. Abb. 13 ist jedoch für Vergleiche besser geeignet.

Während also beim UpA und UpA-N-1-oxid die K_m -Werte gleich bleiben, ist der k_{+2} -Wert von UpA-N-1-oxid um einen Faktor 66 kleiner als der von UpA, und der k_{+2} -Wert von UpC-N-3-oxid liegt um einen Faktor 13 niedriger als der von UpC.

Da dieser Effekt sowohl auf einer Veränderung des π -Elektronensystems der 5'-Nucleobase als auch auf einer sterischen Hinderung durch das Sauerstoffatom des N-Oxids beruhen könnte, wurde der Einfluß einer Methylgruppe in analoger Stellung geprüft: die Umesterung von CpU und CpU-N-3-Methyl verläuft gleich schnell, d.h. die Methylgruppe am 5'-Nucleosid hat keinen Einfluß auf die Reaktion.

2. An Hand thermodynamischer Untersuchungen kann geklärt werden, ob die Erhöhung der k_{+2} -Werte bei Dinucleosidphosphaten auf Veränderungen des Enthalpie-Terms oder des Entropie-Terms beruhen, ob also die 5'-Nucleobase die Aktivierungsenergien für die Tautomerieübergänge der Pyrimidinbase herabsetzt oder ob sie eine Orientierung und Fixierung der Reaktionspartner bewirkt.

In den Abb. 14 u. 15 sind die $e/v-1/s$ -Diagramme für die Umesterung von UpA bei verschiedenen Temperaturen wiedergegeben, deren Ergebnisse in Tab. 10 zusammengestellt sind:

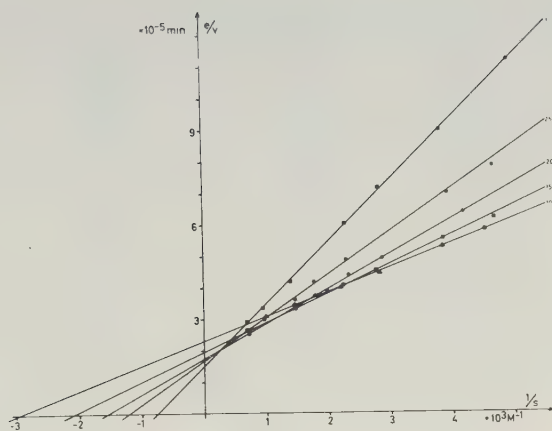


Abb. 14

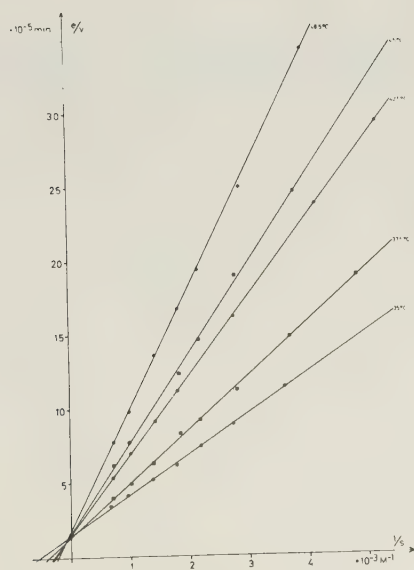


Abb. 15

T (°C)	K_m ($10^{-3}M$)	k_{+2} (sec^{-1})	k_{+2}/K_m ($10^6 sec/M$)
10	0,35	730	2,09
15	0,48	855	1,78
20	0,65	960	1,49
25	0,81	1000	1,24
30	1,30	1110	0,86
35	1,90	1150	0,61
37,5	2,70	1230	0,46
42,5	3,50	1090	0,31
45	3,80	1050	0,28
48,5	4,65	940	0,20

Tab. 10 pH 7,0 - I = 0,2 M
in Dimethylglutarsäure/NaOH-Puffer

Abb. 16 zeigt $\log k_{+2}$, $\log K_m$ und $\log k_{+2}/K_m$
in Abhängigkeit von $1/T$:

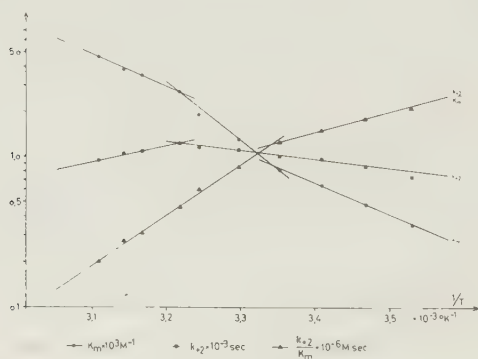


Abb. 16

Die Knickpunkte in Abb.16 haben sicherlich keine physikalische Bedeutung. Vielmehr dürfte es sich um Uebergänge handeln, die sich in einem bestimmten Intervall abspielen. Diese Darstellung wurde nur gewählt, um die verschiedenen Temperaturbereiche deutlich zu machen, in denen diese Diagramme ausgewertet wurden.

Unter Verwendung von Abb.16 lassen sich aus den k_{+2} -Werten und ihrer Temperaturabhängigkeit für den Uebergang vom enzymstabilisierten Zwischenzustand EZ zum aktivierten Uebergangszustand EZ^* für verschiedene Temperaturen Werte für ΔH_2^* , ΔG_2^* und ΔS_2^* berechnen.

Nach der Theorie von Eyring (s. 20) gilt für k_{+2} :

$$k_{+2} = (k_B/h) \cdot T \cdot K_2^* \quad \text{Gl. 42}$$

worin k_B die Boltzmann-Konstante, h die Plancksche Konstante und K_2^* die Konstante des Gleichgewichts $EZ \rightleftharpoons EZ^*$ sind. Mit

$$RT \cdot \ln K_2^* = - \Delta G_2^* = T \cdot \Delta S_2^* - \Delta H_2^* \quad \text{Gl. 43}$$

folgt aus Gl.42

$$\ln k_{+2} = \ln(k_B/h) + \ln T - \frac{\Delta G_2^*}{RT} \quad \text{Gl. 44}$$

$$\ln k_{+2} = \ln(k_B/h) + \ln T - \frac{\Delta H_2^*}{RT} + \frac{\Delta S_2^*}{R} \quad \text{Gl. 45}$$

und für die Temperaturabhängigkeit von k_{+2}

$$\frac{d (\ln k_{+2})}{d (1/T)} = - \frac{\Delta H_2^* + RT}{R} \quad \text{Gl. 46}$$

Somit kann für jede Temperatur T nach Gl.46 aus der Steigung der Geraden (exakt: Tangente im Punkte $1/T$) im $\log k_{+2}-1/T$ -Diagramm $\Delta H_2^\times$ ermittelt werden, und aus den zugehörigen k_{+2} -Werten läßt sich $\Delta G_2^\times$ nach Gl.44 oder Gl.43 und $\Delta S_2^\times$ nach Gl.43 oder Gl.45 berechnen.

Die so für 25°C und 45°C ermittelten Werte sind in Tab. 11 aufgeführt, die durch die entsprechenden Werte von $C_p(c)$ -aus Abb.9, Tab.6- ergänzt wurde.

	T (°C)	$\Delta H_2^\times$ (kcal/Mol)	$\Delta G_2^\times$ (kcal/Mol)	$\Delta S_2^\times$ (e.u.)
a	25	+2,15	+13,3	-37,4
a	45	-5,43	+14,2	-61,8
b	25	+2,49	+16,2	-46,0
b	45	+2,45	+17,5	-46,1

Tab. 11 a. UpA in Dimethylglutarsäure/NaOH-Puffer
 b. $C_p(c)$ in NaCl-Lösung
 pH 7,0 - I = 0,2 M

Aus K_m lassen sich keine physikalisch bedeutungsvollen thermodynamischen Parameter berechnen, da im Kapitel A gezeigt werden konnte, daß K_m bei der RNase-Reaktion keine Dissoziationskonstante eines Enzym-Substrat-Komplexes darstellt. Deshalb darf K_m nicht als thermodynamisch eindeutige Größe behandelt werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, zu Aussagen über die Bildung des enzymstabilisierten Zwischenzustands EZ aus $E + S$ zu kommen, wenn man k_{+2}/K_m als ein Maß für k_{+1} nimmt, da k_{-1} und k_{+2} gekoppelte Konstanten sind.

$$\text{Setzt man } k_{-1} = (f-1) \cdot k_{+2} \quad \text{Gl. 47}$$

$$\text{so gilt } K_M = (k_{-1} + k_{+2}) / k_{+1} = f \cdot k_{+2} / k_{+1}$$

$$k_{+1} = \frac{f \cdot k_{+2}}{K_M} \quad \text{Gl. 48}$$

Damit erhält man analog zur Ableitung auf Seite 49:

$$\frac{k_{+2}}{K_M} = \frac{k_B}{h} \cdot T \cdot \frac{1}{f} \cdot K_1^x \quad \text{Gl. 42a}$$

$$RT \cdot \ln K_1^x = -\Delta G_1^x = T \cdot \Delta S_1^x - \Delta H_1^x \quad \text{Gl. 43a}$$

$$\ln \frac{k_{+2}}{K_M} = \ln \frac{k_B}{h} + \ln T - \ln f - \frac{\Delta G_1^x}{RT} \quad \text{Gl. 44a}$$

$$\ln \frac{k_{+2}}{K_M} = \ln \frac{k_B}{h} + \ln T - \ln f - \frac{\Delta H_1^x}{RT} + \frac{\Delta S_1^x}{R} \quad \text{Gl. 45a}$$

und für die Temperaturabhängigkeit von k_{+2}/K_M

$$\frac{d \ln(k_{+2}/K_M)}{d (1/T)} = - \frac{\Delta H_1^x + RT}{R} \quad \text{Gl. 46a}$$

Somit lassen sich ΔH_1^x aus dem $\log(k_{+2}/K_M) - 1/T$ -Diagramm entnehmen und $(\Delta G_1^x + RT \cdot \ln f)$ nach Gl. 44a und $(\Delta S_1^x - R \cdot \ln f)$ nach Gl. 45a berechnen. Die so erhaltenen Werte sind in Tab. 12 zusammengestellt, wobei der Faktor f beim UpA mit f' , beim Cp(c) mit f'' bezeichnet wurde. (Allerdings dürfen die aufgeführten ΔG_1^x - und ΔS_1^x -Werte wegen der unbekannten Größe von f nur zu Vergleichen herangezogen werden, jedoch nicht in ihren Zahlenwerten betrachtet werden.) Die Ergebnisse aus Tab. 11 und 12 werden im Abschnitt CIV im Zusammenhang diskutiert.

	T (°C)	ΔH_1^* (kcal/Mol)	ΔG_1^* (kcal/Mol)	ΔS_1^* (e.u.)
a.	25	-6,69	+9,10 -1,36 · log f'	-53,0 +4,05 · log f'
a.	45	-15,73	+10,75 -1,45 · log f'	-83,5 +4,55 · log f'
b.	25	-7,71	+12,90 -1,36 · log f''	-69,0 +4,05 · log f''
b.	45	-7,75	+14,30 -1,45 · log f''	-69,4 +4,55 · log f''

Tab. 12 a. UpA in Dimethylglutarsäure/NaOH-Puffer
 b. Cp(c) in NaCl-Lösung
 pH 7,0 - I = 0,2 M

3. Unter den Substraten, bei denen eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen den Heterocyclen ebenso möglich sein sollte wie bei den bisher untersuchten Dinucleosidphosphaten, bei denen jedoch keine dadurch bedingte Orientierung des Reaktionsortes erfolgen sollte, wurden ApCp(c) und ApCp-methyl herangezogen.

Abb. 17 zeigt die e/v-l/s-Diagramme von ApCp(c) und Cp(c). Diese Werte sind in Tab. 13 zusammengestellt. Die k_{+2} -Werte der Methylester wurden unter der Annahme berechnet, daß die K_m -Werte gleich denen der entsprechenden cyclischen Diester sind (siehe experimenteller Teil).

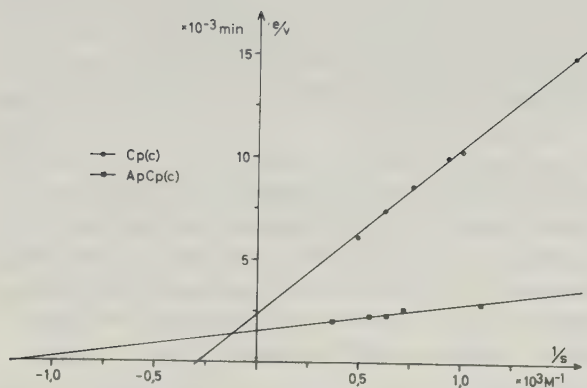


Abb. 17

Substrat	K_m ($10^{-3}M$)	k_{+2} (sec^{-1})
Cp(c)	3,5	7,3
Cp-methyl	3,5 +)	1,4
ApCp(c)	0,9	11,1
ApCp-methyl	0,9 +)	1,0

Tab. 13 pH 7,0 - 25°C - I = 0,2M
in Dimethylglutars./NaOH-Puffer
+) wie beim cyclischen Diester
angenommen.

III. Diskussion zur Bindung zwischen dem 5'-Nucleosid und der RNase (s. C1b)

Nach Rabin (4) soll bei Dinucleosidphosphaten und RNS als Substraten eine Bindung zwischen einem zweiten Zentrum der RNase und einer Hydroxylgruppe der Ribose des 5'-Nucleosids erfolgen. Dadurch soll die Rotation um die Internucleotidbindung so stark eingeschränkt werden, daß der Angriff des aktiven Zentrums der RNase bevorzugt am Estersauerstoff der P-O-5'-Nucleosid-Bindung erfolgt, so daß die Produktbildung beschleunigt würde (s. Abb.5, S.26).

Dieser Effekt soll beim Adenosin so groß sein, daß er zur Erklärung der Spaltung von Polyadenylsäure herangezogen wird, die Beers (25) beobachtete und die der bekannten Substratspezifität widerspricht.

Dabei läßt Rabin zwei wichtige Fragen unbeantwortet: Weshalb hängt dieser Effekt von der Natur der 5'-Nucleobase ab, wenn die Bindung an der Ribose erfolgen soll, und weshalb wird ApA nicht gespalten, wenn die identische Bindung bei der Polyadenylsäure fest genug sein soll, um eine Reaktion zu ermöglichen?

Daraus folgt: wenn eine Bindung des 5'-Nucleosids vorliegt, dann muß die Base an der Bindung beteiligt sein. Andernfalls könnten nicht so große Unterschiede auftreten, wie sie zwischen UpA und UpU (Faktor von 100) gefunden wurden.

Nachdem wir gezeigt haben, daß der Mechanismus von Rabin nicht haltbar ist, können die Folgeerscheinungen einer solchen Bindung nur auf der Basis des in Kapitel A entwickelten Mechanismus diskutiert werden.

Wie bei der Zuordnung der Konstanten bereits nachgewiesen wurde, muß diese Bindung die Bildung (k_{+1}) des enzymstabilisierten Zwischenzustands genauso beschleunigen wie dessen Zerfall, denn K_m kann nur konstant bleiben, wenn k_{+1} und k_{-1} um denselben Faktor verändert sind wie k_{+2} .

Um aber k_{+1} direkt beeinflussen zu können, muß diese Bindung der Ausbildung des enzymstabilisierten Zwischenzustands vorgelagert sein. Ein solches Reaktionsschema würde aber -für den hier gegebenen Fall $K_m \ll 1$ - den Typ einer rein kompetitiven Aktivierung liefern. Würde diese Bindung noch eine zusätzliche Orientierung bewirken, so daß k_{+2} vergrößert wäre, müßte ein gemischter Typ resultieren, der höhere k_{+2} -Werte und veränderte K_m -Werte lieferte. Das ist aber konträr zu den Fakten.

Auch aus einem anderen Grund muß die Annahme einer derartigen Bindung verworfen werden: Da die Pyrimidinbasen als 5'-Nucleoside die k_{+2} -Werte ebenfalls erhöhen, müßten sie als Basen der 3'-Nucleotide ebenso an diesem zweiten Zentrum der RNase gebunden werden, und zwar Cytidin stärker als Uridin. Dann müßten beim CpC beide Cytidinreste mit gleicher Wahrscheinlichkeit außerhalb des aktiven Zentrums gebunden werden, beim UpC aber bevorzugt das 5'-Nucleosid, d.h. beim UpC wäre der aktivierende Einfluß des Cytidin größer als beim CpC.

Analoges kann für CpG, UpG und CpA, UpA abgeleitet werden. Dementsprechend sollten Cp-Ester weniger aktiviert werden als Up-Ester. Da sich aber die k_{+2} -Werte von CpR zu UpR wie die k_{+2} -Werte von Cp(c) zu Up(c) verhalten (9), widersprechen die Fakten abermals der Bindung des 5'-Nucleosids an einem zweiten Zentrum der RNase.

Außerdem müßte eine derartig feste Bindung bei der Hydrolyse von cyclischen Diestern zu einem abnormen Kinetiktyp führen: ein Teil des Substrats würde an diesem zweiten Zentrum gebunden, dessen Sättigungskonzentration nach den obigen Argumenten stets kleiner sein sollte als die für das aktive Zentrum. Dann wäre eine lineare Abhängigkeit zwischen e/v und $1/s$ aber erst gegeben, wenn die Substratkonzentration größer ist als die Sättigungskonzentration an diesem zweiten Zentrum, was wiederum nicht mit den Fakten in Einklang gebracht werden kann.

Somit kann eine Bindung des 5'-Nucleosids an der RNase nicht für die hohen k_{+2} -Werte und die unveränderten K_m -Werte der Dinucleosidphosphate verantwortlich sein, d.h. Punkt CIb ist ausgeschlossen, und es sind nur noch die Punkte CIc-e in Betracht zu ziehen.

IV. Diskussion über Wechselwirkungen zwischen den beiden Heterocyclen der Dinucleosidphosphate

Derartige Wechselwirkungen (s. C1c-e) könnten einerseits durch Wasserstoffbrücken zwischen den C-4- bzw. C-6-Substituenten der Nucleobasen, andererseits über die π -Elektronensysteme der Heterocyclen erfolgen. Ihre Wirkung könnte dann sowohl in Veränderungen der sterischen Verhältnisse am Reaktionsort als auch in Veränderungen der Aktivierungsenergien durch eine Erhöhung der Polarisierbarkeit der katalysierenden Pyrimidinbase bestehen.

Lägen Wasserstoffbrücken zwischen den Heterocyclen vor, so müßte eine Veränderung der kinetischen Konstanten der cyclischen Diester beim UpA durch Protonenentzug von der C-4-OH-Gruppe (bzw. vom N-3) des Uridins auftreten, jedoch keine derartige Veränderung beim CpA. Eine entgegengesetzte Beeinflussung müßte beim CpU durch Protonenschub zur C-4-NH₂-Gruppe erfolgen jedoch nicht beim UpU. Bei gleichen Basen, z.B. CpC, UpU, sollte überhaupt keine derartige Wechselwirkung möglich sein. Damit könnte aber wieder das Verhältnis der k_{+2} -Werte von CpR zu UpR nicht gleich dem von Cp(c) zu Up(c) sein.

Dieser Protonenschub oder -entzug muß auch zu einer Verschiebung im Verhältnis von Nucleophilie zu Elektrophilie der katalysierenden Base führen, so daß eine Erhöhung in k_{+2} von einer Erniedrigung in k_{+1} begleitet wäre, d.h. k_{+2} und K_m müßten sich gleichsinnig ändern, K_m aber stärker als k_{+2} , was den Befunden widerspricht.

Außerdem ist im CpU-N-3-Methyl die Donoreigenschaft des Uracils nicht mehr vorhanden, d.h. eine solche Wechselwirkung wäre nicht mehr möglich. Es wurde aber gefunden, daß die Umesterung von CpU und CpU-N-3-Methyl gleich schnell verläuft.

Andererseits zeigte sich, daß der Einfluß des 5'-Nucleosids auf die k_{+2} -Werte parallel läuft zur Zunahme der Hypochromie der Dinucleosidphosphate; und Michelson (26) konnte nachweisen, daß diese Hypochromie nicht auf Wasserstoffbrücken beruht.

Die Untersuchungen über Hypochromie (26, 27) und Phosphoreszenzlöschung (28, 29) von Michelson und ORD-Messungen von Tinoco (30, 31) zeigen, daß in den Dinucleosidphosphaten Wechselwirkungen bestehen, die zu einer "Stapelung" der Basen führen, und diese Autoren konnten nachweisen, daß die π -Elektronensysteme der Heterocyclen dafür verantwortlich sind. So wird die Hypochromie von GpUpA durch Hydrierung zum Gp(5,6-Dihydro-)UpA aufgehoben (27).

Durch diese π -Wechselwirkungen wird nicht nur die Konformation der Dinucleosidphosphate und Oligonucleotide stabilisiert, sondern gleichzeitig die π -Elektronensysteme der einzelnen Basen verändert. Die treibende Kraft für diese Stapelungen dürfte in der geringen Neigung der Heterocyclen zur Hydratisierung zu suchen sein.

Witzel und Barnard (9) haben diese Vorstellungen zur Erklärung der kinetischen Besonderheiten der Dinucleosidphosphate herangezogen: Veränderungen des π -Elektronensystems sollten zu Änderungen der Polarisierbarkeit der Pyrimidinbase führen, die an der Katalyse direkt beteiligt ist. Dadurch würden

die Uebergänge in ihre tautomeren Formen erleichtert und Basen- und Säurekatalyse gleichermaßen erhöht. Damit ließen sich die kinetischen Daten der Dinucleosidphosphate interpretieren, denn bei einer Erhöhung von k_{+2} sollten k_{-1} und k_{+1} um denselben Faktor erhöht sein und damit K_M konstant bleiben.

Ein wichtiges Argument hierfür war, daß sowohl der aromatische Charakter der Basen als auch der Einfluß der 5'-Nucleoside auf die k_{+2} -Werte in der Reihenfolge U - C - G - A ansteigen, in der nach Michelson die Hypochromie wächst.

Auch ließ sich mit einer π -Wechselwirkung die Tatsache erklären, daß eine intramolekulare Aktivierung bei Dinucleosidphosphaten mit gleichen Heterocyclen auftritt.

Die in Tab. 9 zusammengestellten Untersuchungen haben ergeben, daß die intramolekulare Aktivierung der Dinucleosidphosphate durch N-Oxydation der 5'-Nucleobasen stark herabgesetzt wird.

So ist der k_{+2} -Wert von UpA um einen Faktor 660 größer als der von Up(c), aber der k_{+2} -Wert von UpA-N-1-oxid ist nur noch um einen Faktor 10 größer als der von Up(c) und etwa gleich dem von UpU. Und während der k_{+2} -Wert von UpC um einen Faktor 18 größer ist als der von Up(c), sinkt der k_{+2} -Wert von UpC-N-3-oxid direkt auf den k_{+2} -Wert von Up(c).

Da die K_M -Werte von UpA und UpA-N-1-oxid konstant sind (1,0 : 1,4), müssen sich außerdem k_{-1} und k_{+1} um denselben Faktor wie k_{+2} verändert haben, wie die Zuordnung der Parameter ergeben hat.

Die Herabsetzung der intramolekularen Aktivierung durch das 5'-Nucleosid bei den N-Oxiden kann einerseits auf den Veränderungen des π -Elektronensystems des Adenins bzw. Cytosins, andererseits auf einer sterischen Hinderung der π -Wechselwirkung durch den semipolar gebundenen Sauerstoff beruhen. Da aber, wie bereits erwähnt, eine Methylgruppe am N-3 des Uracils im CpU keinen Einfluß auf die Reaktion ausübt, müssen Veränderungen des π -Elektronensystems für die beträchtlichen Unterschiede der k_{+2} -Werte verantwortlich sein.

Das steht im Einklang mit Untersuchungen von Chassy und McCormick (32), die solche sterischen Effekte als Grund für die Aufhebung der Fluoreszenzlöschung des FAD im Falle des FA-(N-1-oxid)D ausschließen konnten.

Das bedeutet aber nicht, daß diese π -Wechselwirkungen lediglich die Polarisierbarkeit der Pyrimidinbase erhöhen und dadurch die Aktivierungsenergien für deren Uebergänge in ihre tautomeren Formen senken. Denn an Modellen läßt sich zeigen, daß aus der π -Wechselwirkung noch eine Orientierung des Reaktionsortes resultieren kann: sind die beiden Basen der Dinucleosidphosphate "übereinandergestapelt", so befinden sich im Substrat der C-2-Sauerstoff, die C-2'-OH-Gruppe und der Phosphor, im enzymstabilisierten Zwischenzustand die C-2-OH-Gruppe und die beiden Sauerstoffatome der zu spaltenden Esterbindungen, also die Gruppen, zwischen denen der Bindungsaustausch stattfindet, in unmittelbarer Nachbarschaft.

Außerdem führt die Einschränkung der Rotation um die Internucleotidbindung dazu, daß die Phosphatgruppe nicht vor dem Angriff der RNase abgeschildert wird. Ebenso ist die Rotation der Pyrimidinbase um die N-Glykosidbindung blockiert.

Dieser sterische Effekt muß aber ebenso wie eine Aenderung der Polarisierbarkeit der Pyrimidinbase proportional zur Stärke der π -Wechselwirkung sein. Es können also beide Effekte als Folgeerscheinungen der π -Wechselwirkung für die kinetischen Parameter der Dinucleosidphosphate verantwortlich sein.

Derartige Orientierungen können nicht mehr erfolgen, wenn die aktivierende Base nicht als Esterkomponente des 3'-Pyrimidinnucleotids vorliegt. Das trifft für Substrate wie ApCp(c) und ApCp-Methyl zu, bei denen jedoch die Möglichkeit zu π -Wechselwirkung durchaus noch gegeben ist, wie am Modell gezeigt werden kann.

Die Tatsache, daß der k_{+2} -Wert von ApCp(c) nur um einen Faktor 1,5 größer ist als der von Cp(c), deutet stark darauf hin, daß in den 3'-5'-Dinucleosidphosphaten die π -Katalyse fast ausschließlich auf einer sterischen Orientierung des Reaktionsortes basieren sollte.

Jedoch kann hier eine Reihe anderer Faktoren eine wichtige Rolle spielen: Die Internucleotid-Phosphatgruppe im ApCp(c) kann durch Wechselwirkungen mit der RNase die Reaktion beeinflussen, wie von uns für Dinucleotide beschrieben wurde (33), worauf die Erniedrigung von K_m hindeutet.

Andererseits kann die Nachbarschaft zweier Phosphorsäurediestergruppen zu einer Art unkompetitiver Hemmung (resultierend aus kompetitiver Hemmung mit $i=s$)

führen, und eine weitere Hemmung kann dadurch auftreten, daß die cyclische Phosphatgruppe in eine Lage gebracht wird, in der eine Katalyse durch die Pyrimidinbase erschwert ist.

Auf Grund derartiger Nebeneffekte kann der Faktor zwischen den k_{+2} -Werten von ApCp(c) und Cp(c) verfälscht werden, so daß die π -Wechselwirkung selbst einen stärkeren Einfluß ausüben könnte als aus den Meßergebnissen errechnet wird.

Ferner hat Michelson (28) festgestellt, daß die Phosphoreszenz im ApC weniger stark gelöscht ist als im CpA. Demnach kann auch der Einfluß der zweiten Base bei ApCp-Estern geringer sein als beim CpA.

Besseren Einblick, welche Anteile die Senkung der Aktivierungsenergien für die Tautomerisierung der Pyrimidinbase und die sterische Orientierung des Reaktionsortes an der π -Katalyse haben, sollten die thermodynamischen Parameter $\Delta H^\times$ und $\Delta S^\times$ gewähren.

Die Ergebnisse beim Cp(c) -Abb.9, Seite 37- zeigen die erwartete Temperaturabhängigkeit: einen Anstieg von k_{+2} und K_m mit wachsender Temperatur. Das gilt jedoch beim UpA -Abb. 16, Seite 48- nur in einem Bereich niedrigerer Temperatur, während bei höheren Temperaturen k_{+2} mit steigender Temperatur abfällt und K_m die beschriebenen Unstetigkeiten aufweist.

Dennoch sollten diese Messungen ihren Zweck erfüllen, Aufschluß über die Folgeerscheinungen der π -Wechselwirkung zu geben.

Im vorliegenden Mechanismus läßt sich die RNase-Reaktion in zwei Bereiche zerlegen, die Katalyse an der Phosphatgruppe durch die RNase und die Katalyse durch die Pyrimidinbase, wobei letztere zusätzlich noch durch die 5'-Nucleobase beeinflusst werden kann.

Für den Zerfall des enzymstabilisierten Zwischenzustands EZ (k_{+2}) darf dann die Aktivierung im System Phosphatgruppe - RNase bei den hier eingesetzten Substraten als gleichwertig angesehen werden, d.h. die Differenzen der ΔH_2^* - und ΔS_2^* -Werte sollten nur die Umwandlungen wiedergeben, die an der Pyrimidinbase und bei ihrer Reaktion mit den Estersauerstoffatomen erfolgen müssen, um aus EZ den aktivierten Uebergangszustand EZ^* zu bilden. Und auf Grund der strukturellen Analogie von Cp(c) und Up(c) darf weiter angenommen werden, daß bei diesen cyclischen Diestern die Unterschiede in k_{+2} nicht auf Unterschieden in ΔS_2^* sondern in ΔH_2^* beruhen. Dabei sollte der ΔH_2^* -Term die Uebergänge der Pyrimidinbase in ihre tautomeren Formen wiedergeben, und der ΔS_2^* -Term sollte ein Maß dafür sein, welche Ordnung im Uebergangszustand zur Uebertragung des Protons von der Pyrimidinbase auf die Estersauerstoffatome erzielt werden muß.

Demzufolge muß ein Vergleich der ΔH_2^* - und ΔS_2^* -Werte von UpA und Cp(c) trotz der verschiedenen Pyrimidinbasen darüber Aufschluß geben, welcher der beiden möglichen Effekte den Hauptanteil an der Steigerung der k_{+2} -Werte bei den Dinucleosidphosphaten aufweist. Das soll hier nur für 25°C durchgeführt werden, also für die Temperatur, bei der die Mehrzahl aller Substrate untersucht worden ist.

Die $\Delta H_2^\ddagger$ -Werte von UpA und Cp(c) weisen einen Unterschied von -340 cal/Mol auf. Das bedeutet, der Uebergang des Uracils in die tautomere Form wird durch das Adenosin so gesteigert, daß der k_{+2} -Wert des UpA nur um einen Faktor 1,8 größer sein kann als der k_{+2} -Wert von Cp(c).

Die $\Delta S_2^\ddagger$ -Werte von UpA und Cp(c) weisen einen Unterschied von 8,6 e.u. auf. Demnach muß die Orientierung des Reaktionsortes im UpA so groß sein, daß sie den k_{+2} -Wert von UpA um einen Faktor 77,5 gegenüber Cp(c) steigert.

Daraus folgt: die Erhöhung der k_{+2} -Werte bei den Dinucleosidphosphaten resultiert hauptsächlich aus einer Orientierung des Reaktionsortes, während die Aenderung der Polarisierbarkeit der Pyrimidinbase nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Damit in Einklang ist der Befund, daß beim ApCp(c) der k_{+2} -Wert nur um einen Faktor 1,5 größer ist als der von Cp(c).

Analoge Vergleiche lassen sich auch über die Verhältnisse bei der Bildung (k_{+1}) des enzymstabilisierten Zwischenzustands EZ aus E + S durchführen, wenn man bei den $\Delta S_1^\ddagger$ -Werten annimmt, daß die Faktoren f in Gl.48 bei beiden Substraten identisch sind ($f'=f''$). Wenngleich diese Annahme durch die Kopplung der kinetischen Konstanten gerechtfertigt wird, könnten die folgenden Zahlenwerte dennoch einige Ungenauigkeiten enthalten.

Die $\Delta H_1^\ddagger$ -Werte von UpA und Cp(c) weisen eine Differenz von 1 kcal/Mol auf. Das bedeutet, daß der k_{+1} -Wert von Cp(c) im Enthalpieterm um einen Faktor 5,6 größer ist als der von UpA.

Die $\Delta S_1^\ddagger$ -Werte weisen einen Unterschied von 16,0 e.u. auf. Danach muß die Vororientierung des Reaktionsortes im UpA so groß sein, daß der k_{+1} -Wert von UpA um einen Faktor 3150 gegenüber Cp(c) gesteigert wird.

Dieses Verhalten soll aber erst dann eingehender diskutiert werden, wenn nach einer anderen Meßmethode exakte Werte für k_{+1} bestimmt sind. Denn es muß noch die Möglichkeit einer Temperaturabhängigkeit von $k_{-1} : k_{+2}$ in Betracht gezogen werden, die bei den beiden Substraten verschieden sein könnte, so daß bei der Ableitung von Gl. 46a nicht $d \ln f/d (1/T) = 0$ gesetzt werden dürfte.

Man muß außerdem berücksichtigen, daß bei der Bildung von EZ außer der Nucleophilie des C-2-Sauerstoffs auch die Elektrophilie des aufzunehmenden Protons und die Nucleophilie des die Phosphatgruppe angreifenden Sauerstoffs in die thermodynamischen Parameter eingehen. Sie dürfen aber nicht bei diesen Substraten als völlig gleich betrachtet werden.

Dennoch kann der obige Vergleich der $\Delta S^\ddagger$ - und $\Delta H^\ddagger$ -Werte wegen der großen Unterschiede als ein sicherer Hinweis dafür gewertet werden, daß die π -Wechselwirkung sich hauptsächlich durch eine Fixierung der reagierenden Gruppen des Substratmoleküls auf die Reaktionsgeschwindigkeiten der Dinucleosidphosphate auswirkt.

V. Weitere Diskussion der Temperaturabhängigkeit

Bei der Messung der Temperaturabhängigkeiten wurden einige weitere Effekte beobachtet, die jedoch unerheblich für den Zweck dieser Untersuchungen sind, die nur der Klärung der Folgeerscheinungen von π -Wechselwirkungen dienen sollten. Diese Effekte sollen deshalb hier nur kritisch betrachtet, aber nicht einer genauen Analyse unterzogen werden.

Während die kinetischen Parameter von $C_p(c)$ die erwartete Temperaturabhängigkeit zeigten (Abb. 9, Seite 37), wiesen die Parameter von U_{pA} Unstetigkeiten auf (Abb. 16, Seite 48). Ähnliche Unstetigkeiten wurden auch beim $C_p(c)$ in Gegenwart von Adenosin gefunden (Abb. 9, Seite 37).

Diese Unstetigkeiten beim U_{pA} könnten damit erklärt werden, daß bei höheren Temperaturen die π -Wechselwirkung "zusammenbricht", so daß die zusätzliche Katalyse verringert würde. Dieser Effekt könnte durchaus in einem gewissen Intervall durch die allgemeine, der Temperatur proportionale Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit kompensiert werden, und die Unstetigkeiten gäben dann die Bereiche wieder, in denen ein Temperatureffekt gegenüber einem anderen an Gewicht gewänne.

Auch wäre es möglich, daß ein "Zusammenbruch" der π -Wechselwirkung sich unterschiedlich auf Bildung und Zerfall des enzymstabilisierten Zwischenzustands auswirkt, womit die verschiedenen Unstetigkeiten in K_m und k_{+2} zu deuten wären.

Ebenso muß auch noch eine Temperaturabhängigkeit von $k_{-1} : k_{+2}$ in Betracht gezogen werden, so daß die Temperaturabhängigkeit von k_{+2}/K_m nicht gleich der von k_{+1} wäre. Dadurch könnten die verschiedenartigen Unstetigkeiten auf der Ueberlagerung der unterschiedlichen Temperaturabhängigkeiten der einzelnen Geschwindigkeitskonstanten beruhen.

Das steht keineswegs im Widerspruch zur Kopplung von k_{-1} und k_{+2} , die sich ja nur auf strukturbedingte Änderungen von Nucleophilie und Elektrophilie der katalysierenden Pyrimidinbase bezieht.

D. Der Mechanismus der unkompetitiven Aktivierung

In Kapitel A war die unkompetitive Aktivierung der Hydrolyse cyclischer Mononucleotide durch Adenin-derivate nur für die Zuordnung der kinetischen Parameter der RNase-Reaktion herangezogen worden. Eine Diskussion über den Mechanismus dieser Aktivierung wurde zurückgestellt, weil sie zwangsläufig zu Vergleichen mit der intramolekularen Aktivierung bei Dinucleosidphosphaten führen muß; deshalb sollte deren Natur erst geklärt werden.

Jedoch können die Ergebnisse aus dem vorangehenden Kapitel nicht ohne weiteres auf die unkompetitive Aktivierung übertragen werden, weil in diesem Fall die Wirkung des Aktivators diffusionskontrolliert sein muß.

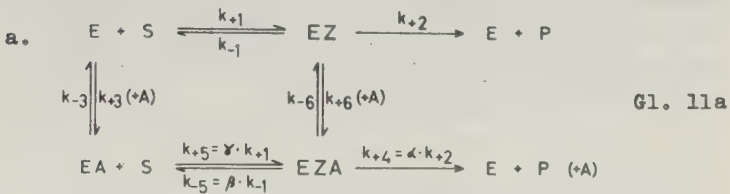
Ferner soll in diesem Kapitel die gleichzeitige Aktivierung und Hemmung der Hydrolyse cyclischer Diester durch Phosphorsäure-monoester des Adenosin näher untersucht werden, was nur auf der Grundlage eines Mechanismus der Aktivierung möglich ist.

I. Reine unkompetitive Aktivierung

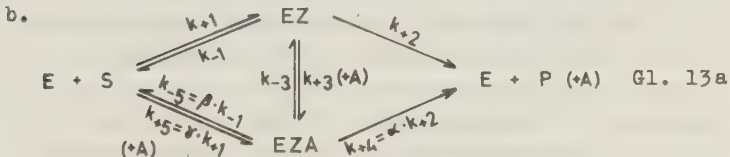
Auf Grund der Diskussion in Kapitel A muß es sich bei der unkompetitiven Aktivierung um eine Erhöhung der Geschwindigkeiten der säurekatalysierten Schritte (k_{-1}, k_{+2}) handeln, während die Basenkatalyse nicht verändert ist.

Das könnte auf einer Erhöhung der Acidität der katalysierenden Pyrimidinbase oder der Nucleophilie der Sauerstoffatome der zu spaltenden P-O-R-Bindungen beruhen, oder auf einer zusätzlichen Ordnung des enzymstabilisierten Zwischenzustands durch sterische Fixierung der Pyrimidinbase oder Einschränkung der Rotation um die Glykosidbindung.

Dabei muß dann eines der beiden Reaktionsschemas (Gl. 11 und Gl. 13) erfüllt werden:



Der Aktivator steht im Gleichgewicht mit dem Enzym (E) und dem enzymstabilisierten Zwischenzustand (EZ), und die Ausbildung der beiden Zwischenzustände EZ und EZA aus S und E bzw. EA wird nicht durch den Aktivator beeinflusst, da $\gamma = 1$ bzw. $k_{+5} = k_{+1}$ sein muß (Gl.24, Seite 17).



Die Bildung des aktivierten Zwischenzustands EZA ist nur möglich durch eine Wechselwirkung oder Bindung des Aktivators am enzymstabilisierten Zwischenzustand EZ, während ein Dreierstoß ($E+S+A$) für die Reaktion unbedeutend ist, da $\gamma = 0$ bzw. $k_{+5} = 0$ sein muß (Gl. 34, Seite 19).

c. Ein Reaktionsschema, das auf einem Gleichgewicht zwischen Substrat und Aktivator basiert, muß ausgeschlossen werden, da es nicht mit der stets beobachteten Linearität zwischen e/v und $1/s$ in Einklang gebracht werden kann (s. S. 15).

Bei einer Bindung des Aktivators an das Enzym müßte entweder eine allosterische Umformung der RNase unter Veränderung des aktiven Zentrums erfolgen (34) oder eine zusätzliche Bindungsstelle an der RNase in Nachbarschaft des aktiven Zentrums existieren. Denn jede Bindung zwischen Enzym und Aktivator muß außerhalb des aktiven Zentrums erfolgen, da andernfalls ausschließlich eine Hemmung der Reaktion auftreten kann.

Eine Veränderung des aktiven Zentrums durch eine allosterische Umformung muß nach dem Mechanismus der RNase-Reaktion die Stabilisierung der Phosphatgruppe, d.h. die Kompensation ihrer negativen Ladungen, im Zwischenzustand verändern. Da nachweislich der Zerfall des Zwischenzustands aktiviert ist ($k^0 > k_{+2}$), müßte deshalb die Nucleophilie der Sauerstoffatome der P-O-R-Bindungen erhöht sein. Durch eine Vergrößerung der Elektronendichte an der

Phosphatgruppe würde aber gleichzeitig der Angriff des H_2O -Sauerstoffs bei der Bildung des Zwischenzustands erschwert werden, d.h. k_{+5} wäre kleiner als k_{+1} bzw. $\gamma < 1$. Die gefundenen Parallelen im $e/v-1/s$ -Diagramm lassen sich aber mit dem Reaktionsschema Gl.11a nur erklären, wenn $\gamma = 1$ ist. Somit kann ein allosterischer Effekt nicht für die unkompetitive Aktivierung verantwortlich sein.

Eine Bindung des Aktivators in Nähe des aktiven Zentrums, die zu einer Veränderung der Stabilisierungsfähigkeit der RNase führt, muß ebenfalls Bildung und Zerfall des Zwischenzustands entgegengesetzt beeinflussen, so daß wiederum keine Parallelen im $e/v-1/s$ -Diagramm auftreten könnten. Somit kann eine Veränderung der Nucleophilie der Estersauerstoffe, hervorgerufen durch eine Bindung des Aktivators an der RNase, als Erklärung für die unkompetitive Aktivierung ausgeschlossen werden.

Jedoch könnte eine Bindung des Aktivators in Nachbarschaft zum aktiven Zentrum bewirken, daß die hohe Ordnung des enzymstabilisierten Zwischenzustands fixiert wird. Dadurch würde zwar nicht die Aktivierungsenergie des Zerfalls gesenkt, aber die freie Drehbarkeit der Pyrimidinbase um die Glykosidbindung würde eingeschränkt und damit k_{+2} und k_{-1} erhöht. Eine Beeinflussung von k_{+1} unterbliebe deshalb, weil bei der Bildung des Zwischenzustands keine zusätzliche Ordnung erfolgen kann, da die Bindung der RNase an die Phosphatgruppe und die Orientierung von Pyrimidinbase zu Phosphatgruppe simultan verlaufen.

Gegen diese Vorstellung spricht aber die -relativ zu den Substraten- niedrige Aktivatorkonzentration

(ca. $15-20 \cdot 10^{-3} M$), die erforderlich ist, um maximale Aktivierung zu erzielen (Abb. 7, Seite 35), was eine sehr feste Bindung des Aktivators an die RNase bedingt. Denn dann sollten die Basen der 5'-Nucleoside der Dinucleosidphosphate (zumindest Adenosin in UpA und CpA) ebenfalls sehr fest an diesem zweiten Zentrum der RNase gebunden werden, da ja ApA als Aktivator fungiert und andererseits gerade die Dinucleosidphosphate die optimalen Abstände für eine derartige Wirkung des Aktivators aufweisen. Eine solche Bindung des 5'-Nucleosids der Dinucleosidphosphate an die RNase konnte aber im vorhergehenden Kapitel ausgeschlossen werden. Somit wird auch die Bindung des Aktivators in Nachbarschaft zum aktiven Zentrum äußerst unwahrscheinlich.

Die niedrige Sättigungskonzentration deutet vielmehr darauf hin, daß der Aktivator nur auf den enzymstabilisierten Zwischenzustand EZ wirkt, also das Reaktionsschema Gl.13a zugrunde liegt. Und es muß ferner angenommen werden, daß die Aktivierung auf einer Wechselwirkung zwischen den beiden Heterocyclen beruht, da jede Wechselwirkung mit der RNase zum Reaktionsschema Gl.11a führen würde.

Beständen zwischen den beiden Basen doppelte Wasserstoffbrücken, wie man sie von den Nucleinsäuredoppelhelices kennt, so würde die Katalyse durch die Pyrimidinbase in jedem Fall blockiert, d.h. es wäre eine Hemmung, jedoch keine Aktivierung zu erwarten. Beständen einfache Wasserstoffbrücken entweder zwischen den C-4-Substituenten oder dem N-3-Atom der Pyrimidinbase und dem Adenin, das beim Zerfall

von EZ noch als Protonendonator fungieren muß, so sollten bei Cp(c) und Up(c) unterschiedliche Aktivierungen hervorgerufen werden. Vergleicht man aber die k_{+2} -Werte analoger Substrate, so findet man diese Verhältnisse: $\text{Cp(c)} + \text{A} : \text{Up(c)} + \text{A} \approx \text{Cp(c)} : \text{Up(c)} \approx \text{CpA} : \text{UpA} \approx 2,5$.

Das deutet darauf hin, daß für die Wechselwirkung zwischen den Heterocyclen dieselben Prinzipien gelten wie bei den Dinucleosidphosphaten, daß also für die unkompetitive Aktivierung ebenfalls π -Wechselwirkungen verantwortlich sind.

Gestützt wird diese Annahme einer π -Wechselwirkung zwischen Substratheterocyclus und Aktivator durch die Ergebnisse mit Adenosin-N-1-oxid: beim Uebergang vom UpA zum UpA-N-1-oxid sinkt der k_{+2} -Wert um einen Faktor 66 ab (Tab.9), und Adenosin-N-1-oxid übt keinen Einfluß mehr auf die Hydrolyse von Cp(c) aus (Tab.1, Abb.1). - Andererseits zeigt ein Aktivator mit intramolekularer π -Wechselwirkung wie ApA eine bemerkenswert stärkere Aktivierung (Tab.1).

Bei einer solchen π -Wechselwirkung zwischen der Pyrimidinbase und dem Aktivator sollte kein merklicher Orientierungseffekt auftreten, weil die Rotation um die Glykosidbindung nicht eingeschränkt wird, sondern es sollte nur die Aktivierungsenergie für den Uebergang der Pyrimidinbase in ihre tautomere Form herabgesetzt sein. Diese Annahme stimmt damit überein, daß eine maximale Erhöhung von k_{+2} um einen Faktor $\varphi_{\text{max}} \approx 2,3$ gefunden wurde, der in derselben Größenordnung liegt wie der Faktor, der für UpA aus der Änderung der Aktivierungsenthalpie $\Delta H_2^\times$ errechnet wurde.

Es erhebt sich nun die Frage, warum durch diese π -Wechselwirkung nicht auch k_{+1} beeinflusst wird. Nach dem RNase-Mechanismus handelt es sich bei der Bildung von EZ um eine komplexe Reaktion, in die der Aktivator nur eingreifen kann, wenn er im Augenblick der Ausbildung und Stabilisierung des penta-kovalenten Phosphors die Nucleophilie der Pyrimidinbase erhöht. Ein solcher Dreierstoß ist aber höchst unwahrscheinlich. Hingegen handelt es sich bei der Aktivierung des Zerfalls um eine bimolekulare Reaktion. Nur wenn die zur π -Wechselwirkung befähigten Heterocyclen nicht der Diffusion unterworfen sind, wie bei den Dinucleosidphosphaten, bleibt auch die Bildung von EZ bimolekular und Bildung und Zerfall werden gleichermaßen betroffen.

Bei höheren Temperaturen ist anscheinend auch k_{+1} verändert, jedoch läßt sich z.Z. noch nicht entscheiden, welche Faktoren dafür verantwortlich sind. Offenbar handelt es sich hier aber um denselben Temperatureinfluß wie beim UpA, denn sowohl beim Cp(c) + Adenosin (Abb.9) als auch beim UpA (Abb.16) tritt bei ca. 30°C eine Veränderung in der Temperaturabhängigkeit von K_m und k_{+2} (bzw. K^0 und k^0) auf, während beim Cp(c) in diesem Bereich eine lineare Abhängigkeit besteht.

Auch läßt sich noch nichts endgültig über die nicht-kompetitive Hemmung von CpA durch Adenosin aussagen.

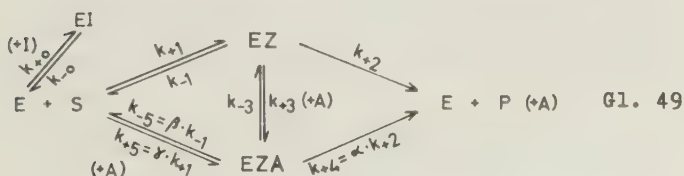
Die Befunde über den Einfluß von Adeninderivaten lassen sich also dann in das Gesamtbild der RNase-Reaktion eingliedern, wenn π -Wechselwirkungen zwischen den Heterocyclen der unkompetitiven Aktivierung zugrunde gelegt werden, während sie keine Argumente gegen eine π -Wechselwirkung (auch nicht bei anderen Substraten wie Dinucleosidphosphaten) liefern.

II. Unkompetitive Aktivierung und kompetitive Hemmung

Die Modifizierung der Hydrolyse von Cp(c) durch die drei Adenosin-monophosphate und ATP zeigt einen Kinetiktyp, der aus unkompetitiver Aktivierung und kompetitiver Hemmung zusammengesetzt zu sein scheint (Abb.10, Seite 39).

Da der Adeninring als unkompetitiver Aktivator identifiziert wurde, muß die Phosphorsäuremonoestergruppe als kompetitiver Inhibitor fungieren. Neben früheren Befunden wird dieser Schluß dadurch gestützt, daß Phosphorsäurediester wie Ap(c) und ApA keine Inhibitoren sind und daß die Phosphorsäuremonoestergruppe eine analoge dianionische Struktur aufweist wie die Diestergruppe der Substrate im enzymstabilisierten Zwischenzustand, so daß eine Bindung der Phosphorsäuremonoester an die RNase über ihre Phosphatgruppe erfolgen kann.

Auf Grund des gemischten Kinetiktyps war es in Kapitel B noch nicht möglich, K_i -Werte direkt aus den gemessenen K_m - und K^0 -Werten nach den gängigen Verfahren (20, 35) zu berechnen. Dieses Ziel ist jetzt zu erreichen, wenn das der unkompetitiven Aktivierung zugrunde liegende Reaktionsschema Gl.13a durch eine kompetitive Hemmung ergänzt wird:



Mit $K_m = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ (Gl.4), $K_i = k_{-0}/k_{+0}$, dem auf Seite 20 abgeleiteten Faktor φ und $a = i$

$$\varphi = \frac{\alpha \cdot k_{+3} \cdot a + \alpha(k_{-1} + k_{+2}) + k_{-3}}{k_{+3} a + \alpha(k_{-1} + k_{+2}) + k_{-3}} = \frac{k^0}{k_{+2}} \quad \text{Gl. 39}$$

folgt nach der steady-state-Methode aus Gl. 49 für die Geschwindigkeit der gehemmten Reaktion v_i :

$$\frac{v_i}{e} = \frac{k_{+2}}{1 + \frac{K_m \cdot \varphi}{s} \cdot \left[1 + \frac{i}{K_i}\right]} \quad \text{Gl. 50}$$

$$\Phi = \varphi \cdot \left[1 + \frac{i}{K_i}\right] \quad \text{Gl. 51}$$

$$6^0 = 5 \cdot \left[1 + \frac{i}{K_i}\right] \quad \text{Gl. 52}$$

Im $e/v-1/s$ -Diagramm schneiden sich die Geraden der unmodifizierten und der modifizierten Reaktion bei einem Wert $1/s'$ (Abb.10-11, Seite 39). Für diesen Punkt gilt $e/v = e/v_i$ und $1/s = 1/s'$. Aus den Geschwindigkeitsgleichungen Gl.2 und Gl.50 folgt:

$$\frac{1}{k_{+2}} + \frac{K_m}{k_{+2}} \cdot \frac{1}{s'} = \frac{1}{\varphi k_{+2}} + \frac{K_m}{k_{+2}} \cdot \frac{1}{s'} \cdot \left[1 + \frac{i}{K_i}\right] \quad \text{Gl. 53}$$

$$1 - \frac{1}{\varphi} = \frac{K_m}{K_i} \cdot \frac{i}{s'} \quad \text{Gl. 54}$$

$$K_i = K_m \cdot \frac{i}{s'} \cdot \frac{\varphi}{\varphi - 1} \quad \text{Gl. 55}$$

Aus den Diagrammen lassen sich die $1/s'$ -Werte und die Faktoren φ der unkompetitiven Aktivierung entnehmen und damit die K_i -Werte für die kompetitive Hemmung durch die Phosphorsäuremonoestergruppe nach Gl.55 berechnen. Die so ermittelten Werte sind in Tab.14 zusammengestellt.

Inhibitor	i ($10^{-3}M$)	φ	$1/s'$ ($10^2 M^{-1}$)	K_i ($10^{-3}M$)
2'-Ap	0,46	1,15	1,50	1,9
3'-Ap	0,44	1,28	4,35	3,0
5'-Ap	0,53	1,13	1,30	2,0
5'-Ap	0,86	1,24	1,30	2,0
ATP	0,42	1,17	0,25	0,25

Tab. 14 Kompetitive Hemmung von Cp(c) ($K_m=3,5 \cdot 10^{-3}M$)

In der Literatur sind einige, meist nur qualitative Angaben über den Einfluß von Adenosin und Adenylsäuren auf die RNase-Reaktion zu finden, jedoch widersprechen sich die meisten Befunde verschiedener Autoren (11, 21, 36-38).

Da in fast allen Fällen nur Inhibitorindices bei einer einzigen konstanten Substrat- und Inhibitor-Konzentration gemessen wurden, konnten allerdings auch nur starke Effekte erfaßt werden. Außerdem wurden viele Ergebnisse nach Meß- und Auswertungsverfahren gewonnen, die eine zu hohe Fehlerbreite aufweisen.

In Anbetracht der Schwierigkeiten beim Vergleich enzymkinetischer Daten, die unter verschiedenen

experimentellen Bedingungen gemessen wurden ⁺), ist es nicht verwunderlich, daß die K_i -Werte von Ukita (21) ca. 15mal größer sind als die in Tab. 14 angegebenen K_i -Werte. Jedoch stimmen die Verhältnisse zwischen 5'-Ap und ATP gut mit denen von Ukita überein. - Ebenso konnte die von Davis und Allen (36) gefundene Reihenfolge der Inhibitorwirkung verschiedener Adenylsäuren bestätigt werden.

Die vorliegenden kinetischen Messungen haben ergeben, daß die Inhibitorwirkungen der Adenylsäuren allein von den Phosphorsäuremonoestergruppen hervorgerufen werden. Innerhalb der Monophosphate unterscheiden sich die K_i -Werte nur wenig, jedoch führt eine Substitution der Phosphatgruppe zu beträchtlichen Veränderungen der Inhibitoreigenschaft: die Einführung einer Triphosphatgruppe erhöht die Hemmwirkung nahezu auf das zehnfache, während eine Veresterung der Phosphorsäuremonoestergruppe (z.B. Ap(c), ApA) die Inhibitoreigenschaft aufhebt und nur noch die Aktivatorwirkung des Adeninrings in Erscheinung treten läßt.

Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß ein Modifizierer einen Kinetiktyp hervorrufen kann, dessen Identifizierung zu einem komplizierten Reaktionsschema führt, wenn man den Modifizierer nur als eine Substanz betrachtet, die in einer

⁺) Untersuchungen hierzu sind im experimentellen Teil (Seite 85) aufgeführt.

einzigsten Wechselwirkung mit dem Enzym oder dem Substrat steht. Es konnte aber auch gezeigt werden, daß es durchaus möglich ist, einen derartigen gemischten Kinetiktyp in einzelne reine Typen zu zerlegen, die bestimmten Strukturen des Modifizierers zuzuordnen sind.

Daran muß auch gedacht werden, wenn andere Nucleotide auf ihre Inhibitoreigenschaften untersucht werden und daraus Rückschlüsse auf das aktive Zentrum der RNase gezogen werden, zumal qualitative Versuche gezeigt haben, daß einige andere Nucleoside keinen reinen Modifizierertyp wie Adenosin hervorrufen. Denn Unterschiede in den K_1 -Werten von Nucleotiden mit verschiedenen Heterocyclen können durchaus auf Überlagerungen von verschiedenen Modifizierungen beruhen. Diese Untersuchungen haben darüber hinaus noch gezeigt, daß ein Modifizierer nicht nur auf das Enzym, sondern auch auf die Substratmolekel wirken kann, wodurch Rückschlüsse auf das Enzym selbst noch schwieriger werden.

E. Zusammenfassung

1. Die mathematische Behandlung der hier erstmals beschriebenen unkompetitiven Aktivierung lieferte die Möglichkeit, die kinetischen Parameter der RNase-Reaktion eindeutig zuzuordnen.
Abweichend von der üblichen Interpretation der Michaelis-Menten-Kinetik wurde festgestellt:
 - a. Ein Gleichgewicht zwischen Enzym und Substrat im Sinne von Michaelis-Menten geht nicht in die Kinetik ein.
 - b. Jeder kinetisch wirksame Schritt verläuft unter Umwandlung homöopolarer Bindungen.
 - c. k_{+1} repräsentiert die Bildung eines enzymstabilisierten Zwischenzustands, k_{-1} dessen rückläufigen Zerfall zum Substrat, k_{+2} dessen Zerfall zum Produkt.
 - d. k_{-1} und k_{+2} sind gekoppelte Konstanten; eine Veränderung der katalysierenden Pyrimidinbase beeinflusst stets k_{-1} und k_{+2} gleichermaßen.
 - e. K_m gibt ausschließlich das Verhältnis von Reaktionskonstanten wieder.
2. Aus den Versuchen mit Up-naphthyl folgt, daß k_{+2} und k_{-1} von etwa gleicher Größenordnung sind.
Somit ist die Behandlung von K_m als k_{-1}/k_{+1} unter Vernachlässigung von k_{+2} nicht erlaubt.
3. Durch diese Zuordnung der kinetischen Parameter kann der RNase-Mechanismus von Rabin (4) als eindeutig widerlegt gelten.

4. Die Untersuchungen über Dinucleosidphosphate haben ergeben, daß ihre intramolekulare Aktivierung auf π -Wechselwirkungen zwischen den Heterocyclen beruht.

Diese π -Wechselwirkung kann einerseits die Aktivierungsenergien der Uebergänge in der katalysierenden Pyrimidinbase verringern und andererseits eine sterische Orientierung am Reaktionsort bewirken.

Die Untersuchungen über ΔH^* und ΔS^* zeigen, daß die sterische Orientierung den Hauptanteil an der intramolekularen Aktivierung hat.

5. Adenin und seine Derivate verursachen eine unkompetitive Aktivierung der Hydrolyse cyclischer Diester, die ebenfalls auf π -Wechselwirkungen zurückgeführt werden muß.

Dadurch wird nur der Zerfall des enzymstabilisierten Zwischenzustands durch Herabsetzung der Aktivierungsenergien der Uebergänge in der katalysierenden Pyrimidinbase aktiviert.

6. Damit konnte nachgewiesen werden, daß die Wirkung eines Aktivators auch auf einer Erhöhung der katalytischen Funktion innerhalb des Substrats beruhen kann, daß im Falle der intramolekularen Aktivierung ein Substratcharakteristikum zugrunde liegen kann und daß eine spezielle Funktion des Enzyms nicht Voraussetzung für eine Aktivierung sein muß.

F. Experimenteller Teil

I. Kinetische Messungen

a. Spektralphotometrische Methode

Unterscheiden sich die Spektren von Substrat und entstehendem Produkt, so läßt sich die Reaktion spektralphotometrisch verfolgen. Das ist fast immer möglich, wenn cyclische Pyrimidinnucleotide als Substrate eingesetzt werden oder als Produkte entstehen.

Diese Messungen wurden mit einem Cary 15 registriert.

In Vergleichs- und Proben-Küvette wird die Pufferlösung gegeben (1,0 ml) und das Substrat entweder mit einer feinen Glaskapillare zugesetzt, wobei die Konzentration an Hand des registrierten Eichspektrums aus der Extinktion der Probenlösung ermittelt wird, oder das Substrat wird mit einer Mikrometerspritze zugegeben, wobei die Konzentration aus der Extinktion der verwendeten Substratlösung und ihrer Menge berechnet wird. Eine gute Mischung wird durch Einblasen von Luft erzielt.

Aus einer mm³-Pipette wird die Enzymlösung (RNase in 0,2M NaCl gelöst) bei laufender Registrierung (konstante Wellenlänge) eingeführt. Gemischt wird wieder durch Einblasen von Luft.

Registriert wird die zeitliche Veränderung der Extinktion. Der Endpunkt, der für die Auswertung unbedingt benötigt wird, ist erreicht, wenn sich die Extinktion im Verlauf von 10 Min. nicht mehr verändert.

Für die Messungen wurden folgende Pufferlösungen verwendet:

1. β, β -Dimethylglutarsäure/Tris pH 7,0 ($I=0,1M$)
2. β, β -Dimethylglutarsäure/NaOH pH 7,0 ($I=0,1M$)
3. $CH_3COOH/NaOH$ pH 5,6 ($I=0,1M$)

Alle Pufferlösungen wurden mit NaCl auf $I = 0,2M$ gebracht.

b. Titrimetrische Methode

Sie beruht darauf, daß bei der Hydrolyse der 2',3'-cyclischen Diester zu 3'-Monoestern ein Proton pro Molekül gebildetes Produkt freigesetzt wird, wenn man bei einem pH-Wert arbeitet, der hinreichend oberhalb des pK_2 -Wertes der Phosphorsäure-monoester liegt.

Die unkompetitive Aktivierung von Cp(c) und Up(c) wurde nach dieser Methode mit einem Titrigraph der Fa. Radiometer (Kopenhagen) aufgenommen.

Zu 1,5 ml NaCl-Lösung ($0,2M$) wird mit einer Mikrometerspritze eine Lösung bestimmter Substratkonzentration zugesetzt und die Reaktionslösung mit $0,02 N$ NaOH auf pH 7,0 titriert.

Aus einer mm^3 -Pipette wird die RNase (in $0,2M$ NaCl gelöst und ebenfalls auf pH 7,0 titriert) bei laufender Registrierung eingeführt. Eine gute Durchmischung wird durch einen Magnetrührer gewährleistet. Registriert wird der Verbrauch an NaOH in Abhängigkeit von der Zeit. Für die Auswertung ist wieder ein Endwert erforderlich.

Bei Zusatz von Modifizierern wird statt der NaCl-Lösung eine Lösung des Modifizierers in $0,2M$ NaCl eingesetzt, dessen Konzentration spektralphotometrisch bestimmt wird.

c. Auswertung

Hierzu wird die Differenz zwischen dem momentanen Wert und dem Endwert in Abständen von 30 sec. aus der Reaktionskurve entnommen und der Logarithmus dieser Differenzen gegen die Zeit aufgetragen. Die so erhaltenen Meßpunkte liefern während der ersten 2,5 - 3 Minuten eine Gerade, deren Steigung ($\text{tg } \alpha$) dem Diagramm entnommen wird. Spätere Abweichungen der Meßpunkte von dieser Geraden werden nicht mehr berücksichtigt.

Für alle eingesetzten Substratkonzentrationen wird die zugehörige Reaktionsgeschwindigkeit v berechnet nach

$$v = 2,303 \cdot s \cdot (\text{tg } \alpha) \quad (\text{Mol/Liter} \cdot \text{min})$$

Aus den so ermittelten v -Werten lassen sich die Lineweaver-Burk-Diagramme zusammenstellen, aus denen die kinetischen Konstanten entnommen werden:

Der Schnittpunkt mit der e/v -Achse ergibt $1/k^0$,
der Schnittpunkt mit der $1/s$ -Achse ergibt $-1/K^0$.

d. Auswertung für UpC-N-3-oxid, Cp-methyl, ApCp-methyl

Da bei diesen Substraten kein Endwert erreicht wird, weil die Hydrolyse des entstehenden cyclischen Diesters mit nahezu gleicher Geschwindigkeit abläuft, wurde hier ein Vergleichsverfahren zur Bestimmung der k_{+2} -Werte herangezogen. - Verglichen wurden

UpC-N-3-oxid und UpC,
Cp-methyl und Cp(c),
ApCp-methyl und ApCp(c).

Hierzu werden Lösungen eingesetzt, die gleiche Konzentrationen der zu vergleichenden Substrate enthalten. Die RNase-Konzentration wird so gewählt,

daß nach 1 Minute maximal 3% Umsatz erzielt wird. Dadurch verläuft die zeitliche Aenderung der Extinktion bei gleicher Wellenlänge praktisch linear, so daß die Gerade durch die Punkte für $t=0$ und $t=1$ min mit den Tangenten an die Reaktionskurven identisch sind. Die Neigung dieser Geraden liefert direkt die Anfangsgeschwindigkeit $v = -ds/dt$.

Unter der Annahme, daß die K_M -Werte der verglichenen Substrate gleich sind, verhalten sich die k_{+2} -Werte wie die gemessenen v/e -Werte. Daraus läßt sich der k_{+2} -Wert des nicht direkt meßbaren Substrats errechnen.

II. Vergleichbarkeit kinetischer Daten

Da in dieser Arbeit hauptsächlich kinetische Messungen als Grundlage für die Diskussion dienten, war es äußerst wichtig, die äußeren Bedingungen (z.B. Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke) zu untersuchen, um zu gewährleisten, daß die beobachteten Effekte exakt nur der jeweils gewählten Variablen zuzuschreiben waren.

Hierzu wurden einige Versuche durchgeführt, die erst an dieser Stelle einer kurzen kritischen Betrachtung unterzogen werden, da sie in keinem direkten Zusammenhang mit dem Problemkreis dieser Arbeit stehen.

Um auch kleinste Schwankungen der Ionenstärke und des pH-Wertes auszuschließen, wurde innerhalb einer Meßserie jeweils nur eine einzige Pufferlösung verwendet. Auch wurden alle hier vorgenommenen Messungen (ausgenommen die Serie über N-Oxide) mit einer einzigen RNase-Präparation durchgeführt, die durch

nachträgliche Reinigung eines käuflichen Präparats gewonnen wurde.

Konnten nicht alle Messungen einer Serie ohne Unterbrechung durchgeführt werden, so wurden entsprechende Kontrollmessungen vorgenommen, z.B. Ueberlappung der Temperaturbereiche bei den thermodynamischen Untersuchungen, durch die die Unstetigkeiten sichergestellt wurden, oder Reproduktion von Standard- und Bezugswerten, wie die Konstanten von $Cp(c)$ bei der unkompetitiven Aktivierung.

Aus meßtechnischen Gründen war es notwendig, den Einfluß von Adenosin titrimetrisch, den von Adenylsäuren spektralphotometrisch zu verfolgen. Deshalb wurde geprüft, ob diese Methoden zu denselben kinetischen Konstanten führen. Abb. 18 zeigt die Hydrolyse von $Cp(c)$ in 0,2 M NaCl-Lösung (titrimetrisch) und in Dimethylglutarsäure/Tris-Puffer (spektralphotometrisch).

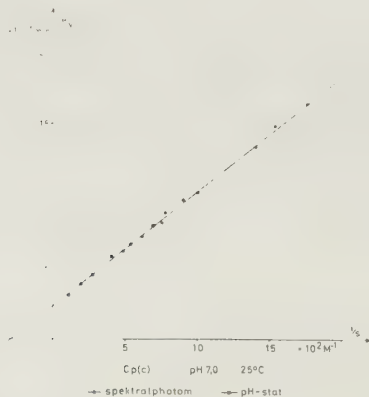


Abb. 18

Diese gute Uebereinstimmung rechtfertigt den Vergleich der mit diesen Methoden erzielten Resultate.

Neben der Ionenstärke und dem pH-Wert können aber auch die Bestandteile einer Pufferlösung selbst eine enzymatische Reaktion beeinflussen. Untersuchungen über die Umesterung von CpC in verschiedenen Pufferlösungen ergaben die in Abb. 19 wiedergegebenen $e/v-1/s$ -Diagramme, deren Ergebnisse in Tab. 15 zusammengestellt sind.

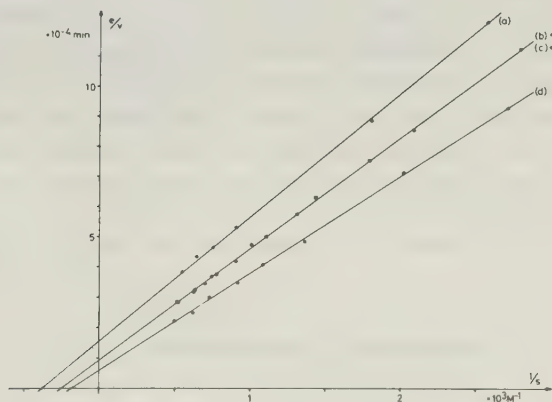


Abb. 19

Puffer	K_m ($10^{-3}M$)	k_{+2} (sec^{-1})
a. Dimethylglutars./Tris	2,6	110
b. Dimethylglutars./NaOH	4,0	180
c. Veronal	4,0	180
d. Imidazol	5,4	280

Tab.15 Kinetische Konstanten von CpC,
pH 7,0 - I = 0,2M - 25° C

Für diese Differenzen mag es eine Reihe von Gründen geben, die hier aber nicht diskutiert werden sollen, da es nicht Zweck dieser Untersuchungen war, diese Beeinflussungen zu klären; hiermit sollten lediglich die verschiedenen und bei früheren Messungen bereits verwendeten Pufferlösungen auf ihre Übereinstimmung geprüft werden.

Diese Untersuchungen zeigen, weshalb es geschehen kann, daß Meßergebnisse verschiedener Arbeitskreise in ihren einzelnen Werten voneinander abweichen, obgleich die meßbaren Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke gleich sind. Derartige Differenzen, die auf Verwendung unterschiedlicher Medien und Methoden beruhen, machen sich meist dadurch bemerkbar, daß zwar die Absolutwerte abweichen, aber die Relationen zwischen den einzelnen Ergebnissen der Arbeitskreise übereinstimmen, wie bereits bei den K_1 -Werten der Adenylsäuren erwähnt wurde.

III. Allgemeine Arbeitsmethoden

a. Papierchromatographie:

Sie wurde absteigend auf Papier der Fa. Schleicher u. Schüll -Nr. 2043 b- durchgeführt. Als Fließmittel wurden verwendet:

1. $i\text{-C}_3\text{H}_7\text{OH} : \text{H}_2\text{O} : \text{NH}_3$ (konz.) = 70 : 30 : 0,3 v/v
2. $i\text{-C}_3\text{H}_7\text{OH} : \text{H}_2\text{O} : \text{NH}_3$ (2N) = 7 : 2 : 1 v/v
3. $i\text{-C}_3\text{H}_7\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOH}$ (0,5N) = 7 : 3 v/v

b. Papierelektrophorese

1. Elektrophorese pH 9,25

Puffer: $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$

Spannung: 1500 V

Stromstärke: 10-20 mA

(Wie in (39) beschrieben)

2. Elektrophorese pH 3,5

Puffer: $\text{CH}_3\text{COOLi}/\text{CH}_3\text{COOH}$

Spannung: 300-400 V

Stromstärke: 3-5 mA

3. Elektrophorese pH 2,8

Elektrolyt: 0,02N HCOOH

Spannung: 250-300 V

Stromstärke: 3-5 mA

Die R_F -Werte sind in der Diplomarbeit angegeben.

c. UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit einem Beckman DU oder einem Cary 15 aufgenommen.

Die zur Konzentrationsbestimmung herangezogenen molaren Extinktionen wurden der Literatur entnommen (13, 23, 40, 41).

IV. Darstellung der Substrate

a. Hydrolyse von RNS mit $\text{Bi}(\text{OH})_3$

Für die Gewinnung von Dinucleosidphosphaten wurde das Verfahren von Dimroth und Witzel (42) verwendet, wie bereits früher beschrieben (33).

b. Hydrolyse von RNS mit RNase

15g Hefe-Ribonucleinsäure (Fa. Zellstoff Waldhof) werden in 1,3 l H_2O gelöst und mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Von einem evtl. Rückstand wird abfiltriert. Zu dieser Lösung werden 50mg RNase -in 10 ml H_2O gelöst- gegeben.

In Abständen von 2-5 Std. wird die Lösung mit NaOH auf pH 7,0 nachtitriert. Das Ende der Reaktion ist erreicht, wenn der pH-Wert konstant bleibt.

Die Lösung wird auf eine Säule mit Dowex 1x2 (Formiat-Form) gegeben. Die Elution erfolgt durch einen Ameisensäure-Gradienten.

Bei diesem Verfahren werden nur RNS-Bausteine mit einem endständigen Pyrimidin-3'-nucleotid erhalten.

c. Darstellung von Cp(c), Up(c), Ap(c) (43)

10mMol des Nucleotids werden in 25ml 2N NH_3 und 50ml Dimethylformamid gelöst. Dazu wird eine Lösung von 50 mMol Dicyclohexyl-carbodiimid (DCC) in 25 ml t-Butanol gegeben. Das Gemisch wird 2 Std. am Rückfluß gekocht.

Nach Abdampfen des t-Butanol i.V. wird mit 200 ml H_2O verdünnt, der ausgefallene Dicyclohexyl-Harnstoff abgesaugt und das Filtrat dreimal mit je 150 ml Aether ausgeschüttelt. Die wäßrige Lösung wird i.V. zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand wird in wenig trockenem CH_3OH gelöst. Mit der gerade ausreichenden Menge $BaBr_2$ in CH_3OH wird das Bariumsalz des cyclischen Nucleotids gefällt. Nach dem Absaugen wird der Rückstand 4x mit CH_3OH , 2x mit CH_3OH /Aether (1:1) und 2x mit Aether gewaschen. Zur Reinheitsprüfung eignet sich die Elektrophorese pH 9,25.

d. Darstellung von ApCp(c) (44)

100 mg ApCp werden in wenig H_2O und 0,2 ml Tributylamin gelöst und nach Zusatz von 0,1 ml Chlorameisensäure-äthylester 30 Min. intensiv geschüttelt. Nach Zugabe von weiteren 0,1 ml $ClCOOC_2H_5$ wird nochmals 30 Min. geschüttelt.

Das Reaktionsgemisch wird durch Papierchromatographie in Fließmittel Isopropanol/ H_2O/NH_3 = 70:30:0,3 gereinigt.

e. Darstellung von Cp-methyl und ApCp-methyl

Als Ausgangsverbindungen dienen die durch RNase-Spaltung von RNS gewonnenen reinen 3'-Phosphorsäuremonoester.

100 mg des Nucleotids oder Dinucleotids werden in H_2O gelöst und mit 1N NaOH auf pH 4,95 titriert.

Die Lösung wird zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand wird in möglichst wenig Dimethylsulfoxid gelöst und mit ätherischer Diazomethan-Lösung versetzt, bis eine schwache Gelbfärbung bestehen bleibt.

Nach Entfernen des Aethers wird mit H_2O auf ca.

250 ml verdünnt. Das Reaktionsgemisch wird durch Säulenchromatographie an Dowex 1x2 (Formiat-Form) mit einem Ameisensäuregradienten gereinigt.

Die Methylester erscheinen als deutlich abgesetzte Fraktionen vor den entsprechenden Monoestern.

Zur Reinheitsprüfung eignet sich die Elektrophorese pH 9,25.

f. Darstellung von Monoperphthalsäure

Hierzu diene das bereits früher ausführlich beschriebene (33) Verfahren von Payne (45).

g. Darstellung von Adenosin-N-1-oxid

6 mMol Monoperphthalsäure in Aether werden mit 1 ml H_2O unterschichtet. Nach dem Abdunsten des Aethers wird die wäßrige Suspension mit 1 N NaOH auf pH 7,0 titriert, wobei eine klare Lösung entstehen soll. Dazu wird eine Lösung von 2 mMol Adenosin in 50 ml H_2O gegeben.

Mit 1 N NaOH wird das Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur ständig auf pH 7,0 gehalten (pH-stat). Nach 24 Std. wird das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet.

Eine Trennung der nucleosidischen Bestandteile von der Phthalsäure gelingt durch Papierchromatographie mit Isopropanol/ CH_3COOH als Fließmittel.

Das Band mit Adenosin-N-1-oxid ($\lambda_{max} = 232 \text{ m}\mu$) wird eluiert und gefriergetrocknet.

Dieses Rohprodukt wird durch Papierelektrophorese pH 2,8 gereinigt.

h. Darstellung von UpA-N-1-oxid und UpC-N-3-oxid

Die Darstellung geschieht analog der oben beschriebenen N-Oxydation von Adenosin. Einzelheiten sind in der Diplomarbeit beschrieben.

i. Darstellung von CpU-N-3-Methyl (22)

CpU wird in wenig H_2O gelöst und mit NaOH neutralisiert. Dazu wird tropfenweise eine ätherische Diazomethanlösung gegeben, bis eine schwache

Gelbfärbung bestehen bleibt.

Nach Abdampfen des Aethers wird das Reaktionsgemisch durch Papierchromatographie mit Isopropanol/ H_2O/NH_3 =7:2:1 getrennt.

Das CpU-N-3-Methyl kann durch NaOH-Hydrolyse, erneute Papierchromatographie und UV-Spektren der Spaltprodukte (41) identifiziert werden.

k. Reinigung von RNase

300 mg RNase (Fa. Hormon Chemie) werden in 50 ml H_2O gelöst und auf eine Säule (50 x 0,7 cm) mit Mischbettaustauscher "Merck V" gegeben. Nachdem die RNase-Lösung vollkommen aufgezogen ist, wird mit H_2O nachgewaschen.

Die Elution der wäßrigen Lösung wird spektralphotometrisch mittels Durchlaufküvette verfolgt. Der Elutionsgipfel wird gefriergetrocknet.

G. Literaturverzeichnis

1. H. Lineweaver, D. Burk,
J. Am. Chem. Soc. 56, 658 (1934)
2. L. Michaelis, M.L. Menten,
Biochem. Z. 49, 333 (1913)
3. G.E. Briggs, J.B.S. Haldane,
Biochem. J. 19, 338 (1925)
4. B.R. Rabin, A.P. Mathias,
in "Mechanismen enzymatischer Reaktionen",
S. 97 (Göttingen, 1964)
5. M. Florin, E.H. Stotz,
"Comprehensive Biochemistry" Vol. 13,
Report of the Commission on Enzymes of the
Intern. Union of Biochem. (Amsterdam, 1964)
6. M.F. Morales,
J. Am. Chem. Soc. 77, 4169 (1955)
7. D. Findlay, A.P. Mathias, B.R. Rabin,
Biochem. J. 85, 134 (1962)
8. R.E. Cathou, G.G. Hammes,
J. Am. Chem. Soc. 87, 4674 (1965)
9. H. Witzel, E.A. Barnard,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 295 (1962)
10. H. Witzel,
in "Progress in Nucleic Acid Research",
Vol. 2, Seite 221 (New York, 1963)
11. G.R. Barker, M.D. Montague, R.J. Ross, M.A. Parsons,
J. Chem. Soc. 3786 (1957)
12. D.G. Herries, A.P. Mathias, B.R. Rabin,
Biochem. J. 85, 127 (1962)
13. H.G. Gassen,
Dissertation, Marburg 1965
14. T.L.V. Ulbricht,
Tetrahedron Letters 1561 (1966)

15. H. Witzel, D. Shugar,
unveröffentlicht
16. V. Henri
"Lois générales de l'action des diastases",
(Paris, 1903)
17. M. Eigen, G.G. Hammes,
in "Advances in Enzymology",
Vol. 25, Seite 1 (New York, 1963)
18. C. Frieden,
J. Biol. Chem. 239, 3522 (1965)
19. H.L. Segal, J.F. Kachmar, P.D. Boyer,
Enzymologia 15, 187 (1952)
20. M. Dixon, E.C. Webb,
"Enzymes" (London, 1964)
21. T. Ukita, K. Waku, M. Irie, O. Hoshino,
J. Biochem. (Tokyo) 50, 405 (1961)
22. R.L.C. Brimacombe, B.E. Griffin, J.A. Haines,
W.J. Haslam, C.B. Reese,
Biochemistry 4, 2452 (1965)
23. F. Cramer, H. Seidel,
Biochim. Biophys. Acta 72, 157 (1963)
24. F. Cramer, K. Randerath, E.A. Schäfer,
Biochim. Biophys. Acta 72, 150 (1963)
25. R.F. Beers,
J. Biol. Chem. 235, 2393 (1960)
26. A.M. Michelson,
Nature 182, 1502 (1958)
27. A.M. Michelson,
"The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides",
Chap.8, p. 445-452, 539-545, (New York, 1963)
28. C. Hélène, P. Douzou, A.M. Michelson,
Biochim. Biophys. Acta 109, 261 (1965)
29. C. Hélène, P. Douzou, A.M. Michelson,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55, 376 (1966)
30. D.N. Holcomb, I. Tinoco jr,
Biopolymers 3, 121 (1965)

31. M.M. Warshaw, I. Tinoco jr,
J. Mol. Biol. 13, 54 (1965)
32. B.M. Chassy, D.B. McCormick,
Biochemistry 4, 2612 (1965)
33. H.-J. Wieker,
Diplomarbeit, Marburg 1964
34. J. Monod, J.-P. Changeux, F. Jacob,
J. Mol. Biol. 6, 306 (1963)
35. J.L. Webb,
"Enzyme and Metabolic Inhibitors", Vol. 1
(New York, 1963)
36. F.F. Davis, F.W. Allen,
J. Biol. Chem. 217, 13 (1955)
37. C.C.S. Cheung, H.I. Abrash,
Biochemistry 3, 1883 (1964)
38. W. Gamble, L.D. Wright,
Biochem. J. 97, 340 (1965)
39. K. Dimroth, H. Witzel,
in "Die Hefen", Seite 403 (Nürnberg, 1960)
40. M.A. Stevens, G.B. Brown,
J. Am. Chem. Soc. 80, 2759 (1958)
41. G.H. Beaven, E.R. Holiday, E.A. Johnson,
in Chargaff, Davidson: "The Nucleic Acids",
Vol. 1, S. 493 (New York, 1955)
42. K. Dimroth, H. Witzel,
Ann. Chem. 620, 109 (1959)
43. R. Lohrmann, H.G. Khorana,
J. Am. Chem. Soc. 86, 4188 (1964)
44. A.M. Michelson,
J. Chem. Soc. 3655 (1959)
45. G.B. Payne,
J. Org. Chem. 24, 1354 (1959)
46. M.L. Bender,
in "Mechanismen enzymatischer Reaktionen",
Seite 47 (Göttingen, 1964)

Meinem verehrten Lehrer

Herrn Dozent Dr. Dr. H. Witzel

danke ich für die Anleitung zur Durchführung dieser Arbeit, die ohne seine Anregungen nicht möglich gewesen wäre, und für die mir während dieser Zeit gewährte Unterstützung.

Lebenslauf

Am 28. März 1937 wurde ich, Hans-Joachim Wieker, als Sohn des Schiffssingenieurs Hans Wieker und seiner Ehefrau Margarete, geb. Lütjen, in Wesermünde (jetzt Bremerhaven) geboren.

Von 1943 bis 1944 besuchte ich die Volksschule in Wesermünde, von 1944 bis 1948 die Volksschule in Loxstedt (Kreis Wesermünde) und von April 1948 das Realgymnasium (jetzt Wilhelm-Raabe-Schule) in Bremerhaven. Dort bestand ich im Februar 1957 die Reifeprüfung.

Seit dem Sommersemester 1957 studiere ich in Marburg Chemie. Hier bestand ich im Mai 1960 die Vordiplomprüfung und im Februar 1963 die Hauptdiplomprüfung.

Unter Anleitung von Herrn Dozent Dr. Dr. H. Witzel beschäftigte ich mich während meiner Diplom- und Doktorarbeit mit biochemischen Problemen. In beiden Arbeiten wurden kinetische Untersuchungen zum Mechanismus der Ribonuclease-Reaktion durchgeführt.

Meine akademischen Lehrer waren:

Balli, Bücher, Dimroth, Hafner, Hünig, Karlson, Kautsky, Kirmse, Kuhn, Mahr, Musso, Pfeil, Schmidt, Walcher, Winkler, Witt, Witzel.

